

19 novembre 1999



**Département amélioration
des méthodes pour
l'innovation scientifique
(CIRAD – Amis)**

Programme Agroalimentaire – Equipe SMANA

**Valorisation de la papaïne et de la bromélaïne :
Application au biofaçonnement des produits alimentaires.**

Thèse en collaboration interdépartementale – CIRAD/Amis et Flhor

Département AMIS (J. Graille et M. Pina)
Département FLHOR (M. Reynes et Ch. Aymard)

Rapport d'activité

Yanis D. CARO

Allocataire de recherche CIRAD
et
Doctorant de l'INP de Toulouse (ENSCT)

CIRAD-DIST
Unité bibliothèque
Lavalette



000100809

VALORISATION DE LA PAPAÏNE ET DE LA BROMELAÏNE : APPLICATION AU BIOFAÇONNEMENT DES PRODUITS ALIMENTAIRES.

Table des matières

INTRODUCTION	1
PARTIE I : DÉTERMINATION DES ACTIVITÉS BIOCATALYTIQUES	4
A. Caractérisation physico-chimique des extraits végétaux	6
A - 1 / Caractéristiques physico-chimiques des latex de papaye.	7
A - 2 / Caractéristiques physico-chimiques des extraits d'ananas.	9
B. Test d'activité protéolytique	10
B - 1 / Activités protéolytiques des latex de papaye.	11
B - 2 / Activités protéolytiques des extraits d'ananas.	14
C. Test d'activité lipolytique.....	15
C - 1 / Conditions optimales pour la détermination des activités lipolytiques.	16
C - 2 / Activités lipolytiques des latex de papaye.	22
C - 3 / Activités lipolytiques des extraits d'ananas.	24
C - 4 / Typosélectivité des lipases de papaye et d'ananas en hydrolyse.	25
D. Test d'activité acyltransférase	29
D - 1 / Activité spécifique de transestérification.	30
D - 2 / Activités acyltransférases lors des réactions de biofaçonnement des corps gras.	32
D - 3 / Etude de la typosélectivité des lipases en interestérification.	39
PARTIE II : SYNTHÈSE DE TRIGLYCÉRIDES À CHAÎNES MOYENNES	43
A. Mise en oeuvre des conditions opératoires optimales	44
A - 1 / Choix des substrats lipidiques adéquats.	45
A - 2 / Influence de la température et de l' a_w en interestérification enzymatique.	46
B. Caractérisation de l'huile de coprah (non interestérifiée)	49
C. Biofaçonnement de l'huile de coprah par interestérification enzymatique.....	50
CONCLUSION	53
RÉFÉRENCES	55

INTRODUCTION

Cette étude financée par le CIRAD en collaboration avec deux de ses Départements, à savoir AMIS et FLHOR, consiste en la caractérisation et la valorisation des activités enzymatiques (protéolytique, lipolytique et acyltransférase) de deux types de préparations végétales issues des cultures de papayer et d'ananas. La première de ces préparations est obtenue par récolte et séchage du latex des fruits verts de papayer : *Carica papaya* (*C. papaya*). La deuxième est obtenue à partir d'un broyage (ou d'un pressurage) de tiges, de feuilles ou de racines d'ananas : *Ananas comosus* (*A. comosus*). L'intérêt économique majeur pour le CIRAD est de trouver une valorisation, autre que fruitière, de ces cultures de papayer et d'ananas en valorisant les sous-produits de celles-ci : latex brut de papaye et rachis, feuilles ou racines d'ananas.

Les latex de papaye ainsi que les rachis d'ananas sont déjà exploités industriellement depuis fort longtemps pour leurs propriétés protéolytiques, notamment dans les industries agro-alimentaires et pharmaceutiques. Ces préparations commerciales sont communément appelées «papaine brute» et «bromélaïne brute», respectivement pour les latex bruts de papaye et les rachis broyés d'ananas. Ces dénominations particulières viennent du fait que ces extraits végétaux à l'état brut sont assimilables à des complexes multi-enzymatiques contenant majoritairement des enzymes protéolytiques, notamment la protéase papaine (EC 3.4.22.2) dans les latex de papaye, et la protéase bromélaïne (EC 3.4.22.33) dans les rachis d'ananas. Ces deux protéases possèdent une structure moléculaire bien établie et font déjà l'objet d'une classification précise en enzymologie, de même que la plupart des autres enzymes contenues dans ces préparations enzymatiques. L'étude d'un point de vue moléculaire de ces enzymes végétales ne fait par conséquent pas partie de ce thème de recherche.

Ces extraits bruts végétaux de papaye et d'ananas présentent généralement des différences d'activités protéolytiques notables selon leurs origines géographiques, et ce pour des raisons encore mal connues actuellement. Par exemple, les meilleures qualités de latex de papaye, du point de vue du demandeur (c'est-à-dire plus fortes activités protéolytiques principalement) sont obtenues au Zaïre, pays généralement instable politiquement. Le prix de revient de ces préparations de «papaine», employées industriellement sous une forme plus ou moins raffinée selon le domaine concerné (agro-alimentaire, cosmétologie, pharmacopée,...)

est souvent calculé en fonction de cette activité protéolytique. L'objectif premier de cette étude est donc de tester les activités enzymatiques des latex de diverses variétés de papayers provenant de zones géographiques «politiquement stables» et où le CIRAD serait déjà implanté (Guadeloupe et Madagascar notamment), afin de vérifier si ce problème de variation de la qualité (qualité en terme d'activité protéolytique et bien d'autres) est d'ordre variétal et/ou écologique. Si l'on peut obtenir localement des qualités de latex supérieures tout en restant à des prix compétitifs, ce type de production permettrait d'accroître le développement économique de ces régions et garantirait au demandeur une sécurité d'approvisionnement. Enfin, si industriellement ces latex de papaye sont majoritairement employés pour les protéases qu'ils contiennent, la présence d'une lipase potentiellement intéressante pour des opérations de biofaçonnement de corps gras a déjà été confirmée dans ces latex bruts. Une sélection des variétés de papayer possédant un bon rendement en fruits à l'hectare et dont le latex exprimerait une forte activité lipasique (en hydrolyse et/ou en transacylation enzymatique) permettrait de proposer de nouvelles valorisations alimentaires ou non alimentaires de ces latex de papaye.

Ces travaux auront aussi pour but d'évaluer les activités enzymatiques des différents extraits bruts d'ananas (tiges, feuilles ou racines) fournies par le CIRAD/FIhor de Guadeloupe et de Côte d'Ivoire. L'étude approfondie des activités enzymatiques des latex bruts de papaye et de ces extraits bruts d'ananas ainsi que leurs comparaisons avec des préparations commerciales de papaïne et de bromélaïne, permettront d'évaluer les paramètres adéquats (choix des variétés, localisation géographique,...) à prendre en compte afin de produire des préparations végétales douées de qualités enzymatiques spécifiques en fonction des usages finaux désirés : protéolyse, lipolyse ou synthèse enzymatique. L'étude du meilleur type d'extraction de la bromélaïne dans les différentes parties végétales des plants d'ananas permettrait aussi d'obtenir des préparations enzymatiques de bromélaïne hautement purifiées.

Le second grand objectif de ces travaux est d'employer au mieux les activités de transacylation des lipases ou des protéases des latex de papaye ainsi que des extraits d'ananas, afin de réaliser le biofaçonnement de divers produits naturels et la fabrication des nouveaux produits de l'agro-alimentaire. Par exemple, nous envisagerons de modifier par interestérification sélective biocatalysée par les lipases du latex de *C. papaya*, la composition glycéridique de quelques corps gras particuliers (huile de coprah,...) dans le but de synthétiser des triacylglycérols à chaînes moyennes (TCM), des bases de margarines, etc. Les TCM

représentent des produits pharmaceutiques à forte valeur ajoutée. Ils sont industriellement fabriqués par voie chimique mais une synthèse enzymatique permettrait de réduire considérablement les coûts de production et d'accroître le caractère «naturel» de ces produits tout en valorisant les latex de papaye (matière première très disponible et peu coûteuse). En fait, seuls les extraits végétaux présentant des activités acyltransférasiques adéquates (ou activités de transfert d'acyles entre divers corps gras lors de réactions de transacylation) seront sélectionnés pour ce type de biofaçonnement.

Nous déterminerons dans une première partie, les différentes activités biocatalytiques des extraits bruts de papaye et d'ananas et nous les comparerons à celles de diverses préparations commerciales de papaïne et de bromélaïne. D'abord, l'activité protéolytique de ces diverses préparations enzymatiques sera évaluée sur un substrat protéique naturel : la caséine ; car il ne faut pas oublier que jusqu'alors, cette activité est le principal attrait industriel du latex de papaye ainsi que des rachis d'ananas. Puis nous nous intéresserons à l'étude de l'activité hydrolytique de ces préparations enzymatiques sur des triacylglycérols (TAGs) ainsi qu'à l'évolution de cette activité lipolytique en fonction des conditions du milieu. La typosélectivité de ces lipases végétales en hydrolyse sera aussi évaluée sur des TAGs à longueurs de chaînes croissantes. Ensuite, après avoir testé l'activité de ces extraits végétaux en hydrolyse enzymatique, nous aborderons l'étude des propriétés acyltransférasiques des lipases présentes dans ces préparations. C'est-à-dire leur aptitude à catalyser des réactions de transacylation (transfert d'acyles entre divers corps gras), notamment des réactions d'interestérification, d'acidolyse et de transestérification. La typosélectivité de ces lipases végétales en interestérification sera aussi évaluée sur des TAGs à longueurs de chaînes croissantes.

Dans une deuxième partie, nous déterminerons les substrats lipidiques adéquats ainsi que les conditions opératoires (température, a_w du biocatalyseur) optimales à mettre en œuvre lors des réactions d'interestérification sélectives biocatalysées par les lipases du latex de *C. papaya*, pour essayer entre autres de biofaçonner l'huile de coprah. L'ensemble de ces travaux devrait donc contribuer à une meilleure connaissance et valorisation des protéases et lipases du latex de papaye ainsi que des extraits d'ananas. Cela permettra de créer de nouvelles applications de ces enzymes au niveau des industries pharmaceutiques et agro-alimentaires et de contribuer aussi au développement des cultures de papayers et d'ananas gérées par le département Flhor du CIRAD.

PARTIE I : DETERMINATION DES ACTIVITES BIOCATALYTIQUES

Les différents lots enzymatiques dont nous disposons pour cette étude sont les suivants :

■ Les préparations commerciales, brutes ou purifiées, de papaïne :

- **Fournisseur : Sigma (France).** Lot : papaïne brute (P-3250). Il s'agit de copeaux de latex brut et séché de *C. papaya* (dénomination anglaise «crude powder»). Ce latex provient d'Afrique.
- **Fournisseur : Merck (France).** Lot : papaïne hydrosoluble (Art. 7144). Cette préparation correspond à la protéase papaïne (EC 3.4.22.2) purifiée du latex de *C. papaya*, après séparation des constituants enzymatiques solubles et non solubles en phase aqueuse.
- **Fournisseur : Reco Industries (Afrique).** Lot : papaïne raffinée (RILS 029905SDP). Cette préparation est constituée de la protéase papaïne (EC 3.4.22.2) obtenue après une étape de raffinage du latex de *C. papaya*.
- **Fournisseur : Valley Research (USA).** Lot : Validase - Papain «conc. sulfite free» (DP 477). Ce lot est constitué de la protéase papaïne (EC.3.4.22.2) purifiée du latex de *C. papaya*. Cette préparation ne contient pas de sulfites, généralement ajoutés aux autres préparations commerciales de papaïne afin de stabiliser l'enzyme et de maintenir son activité enzymatique initiale.

■ Les préparations commerciales brutes de bromélaïne :

- **Fournisseur : Sigma (France).** Lot : bromélaïne brute (B-2252). Il s'agit d'une poudre lyophilisée obtenue à partir des rachis d'ananas.

■ Les latex bruts de *C. papaya* (CIRAD-Flhor) :

- ***C. papaya*, variété "MTQ2 (origine Martinique, accession n°2)"**
en provenance de Guadeloupe (1^{ère} incision du latex)
- ***C. papaya*, variété "Deshaies"**
en provenance de Guadeloupe (1^{ère} et 2^{ème} incision du latex)
- ***C. papaya*, variété locale à gros fruits de Madagascar (issue de la parcelle 38)**
en provenance de Madagascar (1^{ère} et 2^{ème} incision du latex)

Les papayers utilisés pour la récolte du latex dans cette étude sont issus des plantations du CIRAD-Flhor de Guadeloupe et de Madagascar. Ces plantations de papayers sont l'objet de soins intensifs en raison des parasites des cultures et sont renouvelées tous les trois à cinq ans selon les variétés (en raison des baisses de rendement et des difficultés d'extraction du latex). Des travaux de sélection sont indispensables afin de trouver les meilleures variétés

offrant un bon rendement en fruits à l'hectare. Diverses variétés locales (*Deshaies*, *MTQ2*,...) ont été ainsi sélectionnées sur place par autofécondation. La récolte du latex est réalisée sur des pieds des deux sexes (femelles et hermaphrodites) d'une même variété (environ 5 pieds avec 12 fruits par pied en moyenne et 1,8kg pour le poids moyen d'un fruit ; âge des fruits : 2 à 4 mois). Les latex sont obtenus par la méthode de «saignée» et l'extraction est réalisée très tôt dans la matinée avec des lames d'incision en aluminium (3 incisions avec 2-3mm de profondeur), des collecteurs en plastique et des bocaux de verre pour la récupération du latex. Les différents latex exsudés sont récoltés et séchés à l'étuve (55-60°C pendant 16 à 20 heures). Ces lots «artisanaux» de latex brut de *C. papaya* sont ensuite conditionnés sous cellophane et directement envoyés par avion jusqu'au laboratoire de Lipotechnie du CIRAD/Amis à Montpellier, où ils sont stockés à une température de -18°C.

■ **Les extraits bruts végétaux d'*A. comosus* (CIRAD-Flhor) :**

- **Rachis broyés d'*A. comosus*** en provenance de Guadeloupe
- **Feuilles broyées d'*A. comosus*** en provenance de Guadeloupe
- **Racines broyées d'*A. comosus*** en provenance de Côte d'Ivoire
- **Racines pressées (jus) d'*A. comosus*** en provenance de Côte d'Ivoire

Les plants d'*Ananas comosus* employés dans cette étude sont issus des plantations du CIRAD-Flhor de Guadeloupe et de Côte d'Ivoire. Ces plants sont entièrement arrachés après récolte des fruits. Les racines, les tiges et les feuilles sont ensuite séparées les unes des autres. Celles-ci sont lavées séparément à l'eau afin de les débarrasser de leurs impuretés (particules de terre, cailloux, déchets organiques,...) puis séchées à l'air libre pendant quelques heures. Ces tiges, feuilles et racines d'ananas sont broyées séparément à l'aide d'un broyeur électrique à hélice jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Chaque poudre est préalablement conditionnée sous cellophane et envoyée par avion jusqu'au laboratoire de Lipotechnie du CIRAD/Amis à Montpellier. Une partie des racines d'ananas subit aussi un pressurage sous l'effet d'une presse hydraulique, jusqu'à l'obtention d'un jus brut de racines d'ananas de couleur vert brun. Ce jus est ensuite conditionné sous cellophane, congelé et conservé dans un compartiment à glace à une température de -18°C. Ce jus brut de racines est envoyé par avion (conservation au froid) jusqu'au laboratoire de Lipotechnie du CIRAD/Amis à Montpellier.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la caractérisation physico-chimique des différents extraits bruts végétaux puis à la détermination de leurs activités biocatalytiques. En effet, la mise en œuvre d'une préparation enzymatique végétale dans des réactions de biofaçonnement de produits alimentaires (et notamment dans des réactions de biofaçonnement de corps gras) nécessite avant tout la mise au point d'un procédé simple de séparation et de caractérisation des diverses activités enzymatiques ; dans la suite de ces travaux, nous avons essentiellement étudié l'aptitude de ces extraits bruts végétaux à catalyser des réactions de protéolyse, de lipolyse et de transacylation enzymatique. Dans le cas des latex de papaye, les différentes activités enzymatiques seront étudiées en fonction de la localisation géographique des cultures, de l'espèce et des cultivars employés ainsi que de la fréquence des saignées ; tous les autres paramètres de 'récolte du latex' étant dorénavant fixés :

- *heure de récolte (très tôt dans la matinée),*
- *arbres sélectionnés (femelles et hermaphrodites),*
- *maturité des fruits (2 à 4 mois),*
- *nombre d'incision (3 incisions ; 2-3 mm de profondeur)*
- *et technologie de collecte/séchage (latex exsudé récolté dans des bocaux de verre puis séché à l'étuve à 55-60°C pendant 16 à 20 heures).*

Les activités enzymatiques de ces latex bruts seront comparées à celles de lots commerciaux bruts ou purifiés de papaine qui présentent des différences d'activités notables selon des raisons encore mal connues actuellement (localisation géographique des cultures, variété,...). L'ensemble des résultats nous renseignera aussi sur le choix adéquat du latex à employer dans tel ou tel type d'application industrielle, en fonction de la «richesse enzymatique» de celui-ci et de son aptitude à catalyser tel ou tel type de réaction. Dans le cas des extraits bruts d'ananas, nous tenterons pour la première fois d'évaluer indépendamment chaque activité enzymatique (en protéolyse, en lipolyse et en transacylation enzymatique) en fonction de la partie de la plante employée (tige, feuilles ou racines).

A. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES EXTRAITS VEGETAUX

Les préparations enzymatiques non solubles sont en fait de la matière végétale brute (c'est à dire sans étape d'extraction/purification enzymatique). Ces préparations contiennent divers constituants enzymatiques solubles et non solubles en phase aqueuse. Les résultats montrent que seules les préparations commerciales purifiées de papaine ou de bromélaïne sont solubles en phase aqueuse ; les préparations de papaine ont certainement été traitées industriellement selon le mode opératoire classique suivant :

- lavage à l'eau du latex brut et broyé de *C. papaya*,
- séparation de la phase aqueuse et des particules de latex non solubles,
- traitement de la phase aqueuse, récupération et séchage des constituants enzymatiques hydrosolubles (toutes les protéases telles que la papaïne, chymopapaïne, ...),
- lyophilisation de l'extrait obtenu → poudre enzymatique purifiée.

A - 1 / Caractéristiques physico-chimiques des latex de papaye.

Les valeurs de pH, d'activité de l'eau (a_w) ainsi que les teneurs en eau, en matières sèches et en matières protéiques des différents latex de *C. papaya* sont indiquées dans le tableau I-1 (mesure du pH et de l' a_w à 25°C ; matière sèche déterminée après 24 heures à 103°C ; dosage des matières protéiques par la méthode de Kjeldahl, Nx6,25).

Tableau I-1 : Caractéristiques physico-chimiques des latex de *Carica papaya*

Latex de <i>C. papaya</i>	pH	a_w	Teneur en eau (%)	Matières sèches (%)	Matières protéiques (%)
Papaïne raffinée (Reco Ind° Ltd., Afrique)	4,82	0,30	1,5	98,5	84,6
Papaïne hydrosoluble (Merck)	4,79	0,28	0,9	99,1	50,0
Papaïne purifiée – Validase (Valley Resh. Co.)	4,95	0,38	4,6	95,4	66,7
Latex brut – papaïne 'crude powder' (Sigma)	4,84	0,57	7,8	92,2	60,7
Latex <i>C. papaya</i> "MTQ2" (Guadeloupe)	5,41	0,43	4,5	95,5	68,7
Latex <i>C. papaya</i> "Deshaies" 1°inc. (Guadeloupe)	4,86	0,70	3,8	96,2	70,6
Latex <i>C. papaya</i> "Deshaies" 2°inc. (Guadeloupe)	4,78	0,56	2,8	97,2	71,1
Latex <i>C. papaya</i> "Locale Madagascar" 1°inc.	4,77	0,45	4,4	95,6	69,9
Latex <i>C. papaya</i> "Locale Madagascar" 2°inc.	4,72	0,52	6,6	93,4	66,3

Les pourcentages (p/p) sont exprimés par rapport aux préparations enzymatiques brutes (ou aux extraits végétaux bruts).

Les résultats indiquent que le pH est quasiment le même pour tous les lots. L' a_w varie de 0,28 à 0,38 pour les préparations commerciales purifiées de papaïne et de 0,43 à 0,70 pour les latex bruts de *C. papaya*. Cette a_w résulte en partie de la technologie de séchage employée et chiffre le degré de «disponibilité» de l'eau dans les préparations enzymatiques. Quant à la teneur en eau dans ces divers latex de *C. papaya*, celle-ci varie de 0,90% (papaïne hydrosoluble, Merck) à 7,81% (latex brut *C. papaya*, Sigma). Cependant ces valeurs restent toujours inférieures à 10% montrant bien qu'il s'agit toujours de «produits secs». Les variations de teneur en eau ne sont pas toujours en parfaite adéquation avec les variations d' a_w . Pour les latex bruts de *C. papaya* fournis par le CIRAD-Flhor de Guadeloupe (variétés *Deshaies* et *MTQ2*), les teneurs en eau restent comprises entre 2,8% et 4,5%. Pour les latex fournis par le CIRAD-Flhor de Madagascar (variété locale à gros fruit de la parcelle 38), ces valeurs sont quelque peu supérieures et comprises entre 4,4% et 6,6%. Quant au latex brut commercialisé par Sigma, il présente une teneur en eau supérieure (7,8%) indiquant

certainement l'utilisation d'une technologie de séchage différente de celle employée pour sécher les latex récoltés par le CIRAD/Flhor (55-60°C pendant une vingtaine d'heures à l'étuve). La température de séchage ainsi que le temps d'exposition sont responsables en grande partie des variations de la teneur en eau. Ce qu'il faut aussi savoir, c'est que le séchage des latex à l'air libre est très mauvais en raison des phénomènes d'oxydations. Ces latex contiennent de plus de nombreux cations métalliques qui sont de bons catalyseurs des réactions d'oxydations. Il est donc préférable d'effectuer un séchage dans des compartiments fermés ou dans une étuve. Divers travaux sur la conservation des activités protéolytiques du latex brut de *C. papaya* en fonction de la température de séchage indiquent qu'il paraît judicieux de sécher les latex fraîchement récoltés à 60°C pendant une durée généralement inférieure à 24h. Une température inférieure à 55°C semble inhiber l'activité protéolytique et une température supérieure à 60°C dénature les enzymes.

Le taux de matières protéiques à l'intérieur des préparations commerciales purifiées de papaine rend compte de l'efficacité des étapes d'extraction/purification enzymatiques. Les variations de la teneur en protéines dans ces préparations commerciales sont assez importantes. En effet, cette teneur varie de 50% pour la papaine hydrosoluble commercialisée par Merck, à 85% pour la papaine raffinée commercialisée par Reco Industrie Ltd. Ces variations semblent logiquement s'expliquer par le fait que chaque fournisseur utilise des étapes de raffinage/purification enzymatiques différentes. Les variations de la teneur en protéines dans les latex bruts de *C. papaya* permettent quant à elles de faire une comparaison stricte quant à la richesse de ces latex en matière protéique et donc en constituants enzymatiques. Pour tous les latex bruts de *C. papaya* fournis par le CIRAD-Flhor, la teneur en protéines reste quasiment constante (teneur en protéines : 66-71% p/p). Nous voyons de ce fait que tous les latex bruts de papaye obtenus par cette méthode traditionnelle de saignée renferment quasiment la même teneur en protéines, et ce indépendamment de la variété employée (*Deshaies*, *MTQ2*, ou la variété locale de Madagascar), de la localisation géographique des cultures (Guadeloupe, Madagascar, ...) ou même de la fréquence des saignées (1^{ère} saignée et 2^{ème} saignée réalisées à 5 jours d'intervalle). Le latex brut de papaye commercialisé par Sigma contient une plus faible teneur en protéines, seulement 60 % (p/p) par rapport à l'extrait brut végétal. Cela dit, il ne faut pas perdre de vue que nous ne connaissons pas exactement la part qu'occupent les protéines enzymatiques dans cette fraction protéique totale ainsi déterminée par la méthode de Kjeldhal.

Pour la variété locale de Madagascar, le taux de latex frais obtenu durant la 1^{ère} incision des fruits est 7,0g/kg de fruit et après le procédé de séchage, le taux de latex sec obtenu est de 1,4g/kg de fruit ; durant la 2^{ème} incision (réalisée à 5 jours d'intervalle) le taux de latex frais collecté est 5,6g/kg de fruit et le rendement en latex sec obtenu est de 1,3g/kg de fruit. Les expérimentations indiquent donc qu'il n'y a pas de différences significatives entre le rendement en latex séché obtenu à partir de la 1^{ère} ou de la 2^{ème} saignée des fruits du papayer.

A - 2 / Caractéristiques physico-chimiques des extraits d'ananas.

Les valeurs de pH, d'activité de l'eau ainsi que les teneurs en eau, en matières sèches et en matières protéiques des différents lots d'*A. comosus* sont indiquées dans le tableau I-2 (mesure du pH et de l' a_w à 25°C ; matière sèche déterminée après 24 heures à 103°C ; dosage des matières protéiques par la méthode de Kjeldahl, Nx6,25).

Tableau I-2 : Caractéristiques physico-chimiques des extraits d'*Ananas comosus*

Extraits végétaux d' <i>A. comosus</i>	pH	a_w	Teneur en eau (% ³)	Matière sèche (% ⁴)	Matières protéiques (% ⁴)
Bromélaïne – rachis d'ananas (Sigma)	5,59	0,29	2,9	97,1	38,2
Rachis broyés d' <i>A. comosus</i> (Guadeloupe)	6,20	0,36	5,4	94,6	5,2
Feuilles broyées d' <i>A. comosus</i> (Guadeloupe)	6,40	0,43	6,1	93,9	4,6
Racines broyées d' <i>A. comosus</i> (Côte d'Ivoire)	6,65	0,30	4,4	95,6	3,9
Jus de racines d' <i>A. comosus</i> (Côte d'Ivoire)	-	-	83,7	16,3	0,9

³ Les pourcentages (p/p) sont exprimés par rapport aux préparations enzymatiques brutes (ou aux extraits végétaux bruts).

Les teneurs en matières protéiques des extraits bruts d'*A. comosus* fournis par le CIRAD/FIhor (Guadeloupe et Côte d'Ivoire) restent très inférieures à celle du lot de bromélaïne commercialisée par Sigma (contenant près de 40% de protéines) ; en effet les racines, feuilles et rachis broyés d'*A. comosus* ne sont que de la matière première brute séchée et broyée (sans étape d'extraction/purification enzymatique) et ils contiennent respectivement 3,9%, 4,6% et 5,2% de protéines. Le jus brut de racines d'*A. comosus* contient quant à lui 16,3% d'extrait sec et seulement 0,8% de protéines. Le lot commercial de bromélaïne de Sigma (théoriquement constitué de rachis broyés d'*A. comosus*) doit certainement avoir subi des étapes préalables d'extraction/purification enzymatique afin d'accroître la teneur en protéines et à fortiori la teneur en enzymes (bromélaïne, ...) dans l'extrait brut. Cette préparation serait en fait un mélange d'enzymes purifiées à partir des rachis d'ananas

(extraction des enzymes par précipitation acétonique ou avec du sulfate d'ammonium,...). De par ces résultats, il faudra impérativement envisager des essais d'extraction/purification enzymatique à partir des extraits bruts d'ananas fournis par le CIRAD/Flhor. Cela permettra d'évaluer notamment la teneur en bromélaïne dans chaque partie de la plante (rachis, feuilles et racines).

La valeur moyenne de pH des divers extraits d'*A. comosus* (exception faite pour le jus de racines) est de 6,21 avec un écart-type de 0,45. Quant à la teneur en eau dans ces mêmes extraits bruts d'ananas fournis par le CIRAD/Flhor (Guadeloupe et Côte d'Ivoire), elle varie de 4,4% à 6,1%. Le lot de bromélaïne brute commercialisé par Sigma renferme une teneur en eau beaucoup plus faible (2,9%). Ces résultats semblent indiquer l'utilisation d'une technologie de séchage différente pour ce lot commercial de bromélaïne. Cependant, les valeurs d' A_w restent plus ou moins dans le même ordre de grandeur, avec une a_w qui varie de 0,29 à 0,43 ($m = 0,34$ et $\sigma = 0,06$).

B. TEST D'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE

Nous avons voulu tester l'activité protéolytique des protéases contenues dans les extraits végétaux de *C. papaya* et d'*A. comosus*. Le substrat protéique naturel utilisé lors de l'hydrolyse enzymatique est la caséine. Diverses études antérieures ont déjà établi les conditions optimales d'hydrolyse de ce substrat par les protéases du latex de *C. papaya* [Mc Kee *et al*, 1986] et des rachis d'*Ananas comosus*. Les réactions d'hydrolyse sont stabilisées à 45°C et à pH 7,5 (température optimale et pH optimal d'hydrolyse de la caséine par les protéases du latex de *C. papaya*). La teneur en caséine employée est de 100g/l et le rapport "préparation enzymatique/substrat" est de 0,5% (p/p). Le titrage des groupements aminés libérés est réalisé par titrimétrie à pH-Stat (coefficient de dissociation des groupements aminés : $\alpha=0,66$). L'activité protéolytique (A_p) est calculée mathématiquement entre 0 et 10 minutes de réaction, grâce à une régression de la courbe d'hydrolyse par polynôme du second degré ($Y = at^2 + bt + c$). Le coefficient «b» représente la vitesse initiale (V_0) de la réaction : car à $t=0$, la dérivée ($2at + b$) est égale à «b». Cette méthode de détermination par régression polynomiale permet d'obtenir de bien meilleurs résultats que la méthode usuelle qui consiste à effectuer une régression linéaire de la partie initiale de la courbe d'hydrolyse afin d'en déterminer la pente à l'origine. En effet, ce mode d'évaluation « linéaire » donne souvent (et d'autant plus que la courbe de progression est curviligne) une

sous-estimation de la vitesse initiale de la réaction. Les Ap correspondent aux vitesses initiales des réactions d'hydrolyse et sont exprimées en unités protéasiques (UP) par gramme de préparation enzymatique. Une UP correspond à une micro-équivalence (µéqv.) de liaisons peptidiques rompues par minute.

B - 1 / Activités protéolytiques des latex de papaye.

Les valeurs d'activité protéolytiques (Ap) des divers latex de *C. papaya* sont répertoriées dans le tableau II (avec et sans activateurs). Les résultats correspondent aux moyennes arithmétiques de trois séries d'analyses réalisées dans les mêmes conditions. Les tests avec activateurs ont été menés avec un ajout de dithiothréitol (DTT) : 2 mM et d'éthylène diamine trétracétate (EDTA) : 10 mM.

Tableau II : Activités protéolytiques des latex de *C. papaya*.

Préparations enzymatiques	Activités protéolytiques (UP / g)		
	Sans activateur	Avec activateurs	Facteur
	Ap ^a ± σ ^b (σ % ^c)	Ap ^a ± σ ^b (± σ % ^c)	d'activation
Papaïne raffinée : (Reco Industry Ltd.)	10046 ± 364 (3,6%)	11352 ± 58 50 (0,5%)	x 1,13
Papaïne hydrosoluble : (Merck)	3379 ± 99 (2,9%)	7381 ± 227 (3,1%)	x 2,18
Papaïne purifiée – validase : (Valley-Research Co.)	1842 ± 144 (7,8%)	5919 ± 68 (1,1%)	x 3,21
Papaïne brute 'crude powder' : (Sigma-Aldrich Ltd.)	1102 ± 28 (2,6%)	3842 ± 229 (6,0%)	x 3,49
Latex brut – 1^{ère} incision			
■ Variété "MTQ2" : (Guadeloupe)	4532 ± 367 (8,1%)	8711 ± 230 (2,6%)	x 1,92
■ Variété "Deshaies" : (Guadeloupe)	5515 ± 93 (1,7%)	9794 ± 191 (2,0%)	x 1,78
■ Variété "Locale-parcelle38" : (Madagascar)	6316 ± 383 (6,1%)	9602 ± 112 (1,2%)	x 1,52
Latex brut – 2^{ème} incision			
■ Variété "Deshaies" : (Guadeloupe)	3752 ± 279 (7,4%)	6474 ± 155 (2,4%)	x 1,73
■ Variété "Locale-parcelle38" : (Madagascar)	3549 ± 159 (4,5%)	5695 ± 433 (7,6%)	x 1,60

^a moyenne d'activité (m) ; ^b écart-type (σ) ; ^c écart-type relatif (σ %).

Les activités sont calculées par pH-Stat avec la caséine à 45°C/10min. et à pH constant 7,5 (avec ou sans activateurs : 2mM DTT + 10mM EDTA). Les réactions sont catalysées par 25mg de préparation enzymatique. Une U.P. correspond à 1µéqv. de liaisons peptidiques rompues par minute.

Pour toutes les préparations enzymatiques testées, on note une nette amélioration de l'activité protéolytique avec l'addition d'activateurs. Pour tous les latex bruts de *C. papaya* de Guadeloupe ou de Madagascar, le facteur d'activation est d'environ 2,0 (1,52 – 1,92). Le latex brut de *C. papaya* commercialisé par Sigma a un facteur d'activation de 3,49 et la préparation commerciale de papaine purifiée – validase « sulfite free » a aussi un facteur d'activation de 3,21. Les autres préparations commerciales de papaine purifiée ont des facteurs d'activation plus faibles, à savoir 2,18 (Merck) et 1,13 (Reco Industrie Ltd.), indiquant que des stabilisateurs de protéases sont certainement déjà présents dans ces préparations. Le DTT (agent réducteur) a pour rôle de rompre les ponts disulfures au sein des protéines, et comme le β -mercaptoéthanol ou la cystéine, il est très souvent employé pour « stabiliser les protéases » c'est à dire activer l'activité protéolytique des thiol-protéases de type cystéine (comme les protéases 'papaine' et 'bromélaïne') qui doivent avoir leur résidu cystéine maintenu sous une forme réduite lors de l'hydrolyse. Cet agent réducteur permet de remédier à l'éventuelle oxydation de la protéase par l'air. Aux doses généralement utilisées (0,5-2mM pour le DTT ou 5-10mM pour le β -mercaptoéthanol et la cystéine), ces agents réducteurs permettent de déstructurer un minimum l'enzyme pour qu'elle soit dans sa configuration optimale afin d'accueillir le substrat et effectuer convenablement son hydrolyse. Quant à l'EDTA, il joue un rôle primordial en tant qu'agent chélateur et il est souvent présent dans les préparations commerciales de papaine purifiée. En effet, à l'état naturel, des cations métalliques (lourds) sont souvent fixés sur la protéase 'papaine' (particulièrement par les fonctions « thiolate » de groupes cystéinyles) et ce complexe cation/protéine ainsi formé, inhibe l'activité de la protéase. Généralement en présence de 5 à 10mM d'EDTA (meilleur chélatant de cations métalliques), la « décomplexation » des groupes thiol, initialement engagés, restaure l'activité protéolytique. C'est pourquoi, en mettant dans le milieu réactionnel des quantités adéquates de DTT (2mM) et d'EDTA (10mM) nous obtenons un rendement d'hydrolyse optimal. Par exemple, l'activité protéasique (sans activateur) de la papaine purifiée commercialisée par Reco Industrie Ltd. est de 10046 UP/g, cette activité passe ensuite à 10981 UP/g avec un ajout de 10mM d'EDTA dans le milieu réactionnel et enfin, avec 10mM d'EDTA et 2mM de DTT, cette activité est optimale (11352 UP/g).

Tous les lots (latex bruts ou préparations purifiées de papaine) présentent une activité protéasique ; ils contiennent donc tous des protéases. Cela dit, certains sont plus ou moins efficaces quant à l'hydrolyse enzymatique de la caséine. Le lot commercial de papaine purifiée présentant la meilleure activité protéolytique est celui commercialisé par Reco

Industries Ltd. (Afrique). Les diverses étapes de purification et de raffinage du latex de papaye ont donc permis d'isoler et de concentrer au maximum les protéases du reste des composés enzymatiques. En comparaison avec ce lot commercial purifié de papaine, tous les latex bruts de papaye provenant des diverses variétés étudiées (CIRAD/Filhor) présentent aussi de fortes activités protéolytiques et ce que l'on considère les papayers originaires de Guadeloupe (8711 à 9794 UP/g) ou de Madagascar (5695 à 6474 UP/g). Les activités protéolytiques de ces latex bruts sont presque égales à celle de la préparation de papaine raffinée commercialisée par Reco Industrie Ltd. (11352 UP/g) et elles sont supérieures à celles des deux autres préparations commerciales de papaine raffinée, à savoir la papaine hydrosoluble commercialisée par Merck (7381 UP/g) et la papaine purifiée 'Validase' commercialisée par Valley Research Co. (5919 UP/g). Ces activités sont de plus très majoritairement supérieures à celle du latex brut commercialisé par Sigma (3842 UP/g). Les résultats indiquent aussi qu'entre la première et la deuxième incision d'un fruit d'une même variété de *C. papaya*, l'activité protéolytique du latex brut récolté reste plus ou moins dans le même ordre de grandeur.

Les latex bruts de Guadeloupe et de Madagascar, disponibles et peu coûteux, constituent donc des matières premières végétales douées d'excellentes activités protéolytiques ; activités satisfaisantes pour une éventuelle valorisation commerciale. Cela répond à l'un des objectifs de nos recherches à savoir de valoriser ces latex bruts de papaye provenant de ces deux régions tropicales, pour des applications industrielles dans des réactions de transformation de protéines (agro-alimentaire, pharmaceutique,...). De plus, le fait que les latex provenant de la première ou de la deuxième incision du fruit contiennent la même activité protéolytique favorise l'exploitation de ces latex au niveau industriel car le rendement en latex récolté (et commercialisé) n'en sera qu'augmenté.

Concernant tous les latex bruts de papaye, la supériorité en terme d'activité protéolytique des latex provenant de Guadeloupe comparés à ceux de Madagascar ou à celui commercialisé par Sigma, peut s'expliquer soit par une localisation géographique différente des cultures, soit par le fait qu'il s'agisse de variétés différentes. Toutes les variétés de papayers cultivées en Guadeloupe (Deshaies, MTQ2,...) renferment cependant des latex de qualités protéolytiques supérieures aux latex provenant des variétés de papayers originaires de Madagascar. Ces résultats semblent à priori indiquer que le facteur primordial serait la localisation géographique des cultures et non la variété employée. Cependant, pour confirmer

cette hypothèse il serait judicieux de cultiver les variétés «Deshaies» et «MTQ2» de *C. papaya* étudiées dans ces travaux, sur le sol de Madagascar afin de vérifier si ces différences d'activités protéolytiques sont bien dues à la localisation géographique et non à la variété. La faible activité protéolytique du latex brut de *C. papaya* commercialisé par Sigma peut aussi s'expliquer par cette hypothèse, étant donné que ce latex provient d'une localisation géographique différente (Afrique). Bien sûr, une technologie de séchage différente aurait aussi pu expliquer ces variations d'activités protéolytiques, car la méthode de séchage employée (durée et température) influence considérablement le «conditionnement de l'enzyme». Une température trop élevée ainsi qu'une durée de séchage trop importante auraient pour effet de dénaturer les protéases et de diminuer l'activité protéolytique du latex. Dans cette étude, cette hypothèse est rejetée car tous les latex bruts récoltés ont été quasiment soumis au même processus de séchage (55-60°C pendant une vingtaine d'heures à l'étuve).

B - 2 / Activités protéolytiques des extraits d'ananas.

Les valeurs d'Ap des divers extraits d'*A. comosus* sont répertoriées dans le tableau III (avec et sans activateurs). Les résultats correspondent aux moyennes arithmétiques de trois séries d'analyses réalisées dans les mêmes conditions. Les tests avec activateurs ont été menés avec un ajout de DTT (2 mM) et d'EDTA (10 mM) dans le milieu réactionnel.

Tableau III : Activités protéolytiques des divers extraits d'*Ananas comosus*.

Préparations enzymatiques	Activités protéolytiques (UP / g)		
	Sans activateur	Avec activateurs	Facteur
	Ap ^a ± σ ^b (± σ % ^c)	Ap ^a ± σ ^b (± σ % ^c)	d'activation
Bromélaïne (rachis d'ananas) : (Sigma-Aldrich Ltd.)	2573 ± 60 (2,3%)	4589 ± 35 (0,8%)	x 1,78
Rachis broyés d'ananas : (CIRAD/Flhor, Guadeloupe)	163 ± 14 (8,5%)	186 ± 6 (3,5%)	-
Feuilles broyées d'ananas : (CIRAD/Flhor, Guadeloupe)	59 ± 7 (11,2%)	80 ± 15 (18,8%)	-
Racines broyées d'ananas : (CIRAD/Flhor, Côte d'Ivoire)	120 ± 10 (8,2%)	140 ± 11 (7,6%)	-
Jus de racines d'ananas : (CIRAD/Flhor, Côte d'Ivoire)	55* ± 7* (12,1%)	68* ± 10* (14,1%)	-

^a moyenne d'activité (m) ; ^b écart-type (σ) ; ^c écart-type relatif (σ %).

Les activités sont calculées par pH-Stat avec la caséine à 45°C/10min. et à pH constant 7,5 (sans ou avec activateurs : 2mM DTT + 10mM EDTA). Les réactions sont catalysées par 25mg de préparation enzymatique. (* sauf pour le jus de racines d'ananas où les réactions ont été catalysées par 250μl de jus brut : les activités sont exprimées en UP/ml de jus). Une U.P. correspond à 1μeqv. de liaisons peptidiques rompues par minute.

L'extrait présentant la meilleure activité protéolytique est le lot commercial de bromélaïne de Sigma-Aldrich Ltd. ; en effet nous obtenons une activité protéolytique de 4589 UP/g (avec activateurs). Quant aux lots "artisansaux" (tiges, feuilles et racines brutes d'*A. comosus* fournies par le CIRAD-Flhor de Guadeloupe et de Côte d'Ivoire) ils présentent tous de très faibles activités protéolytiques (< 200 UP/g) surtout en comparaison avec le lot commercial de Sigma. Cette grande disparité d'activité est cohérente avec les fortes différences de teneur en protéines dans ces préparations enzymatiques, car la préparation de bromélaïne commercialisée par Sigma n'est certainement pas un extrait brut, mais un mélange d'enzymes purifiées à partir des rachis d'ananas ; mélange obtenu après diverses étapes d'extraction/purification enzymatique. Quant aux extraits d'ananas fournis par le CIRAD/Flhor, ce ne sont que des extraits broyés tels quels (sans étape d'extraction/purification enzymatique). En fait, l'activité protéolytique a été déterminée sur ces extraits broyés tels quels afin d'évaluer le potentiel biocatalytique de la matière première brute (peu coûteuse). Les résultats montrent une activité protéasique moindre pour les feuilles d'*A. comosus* comparée à celles des tiges ou des racines. En ce qui concerne l'effet des activateurs, on note une nette amélioration de l'activité protéolytique pour le lot de bromélaïne commercialisée par Sigma, le facteur d'activation est de 1,78. Pour tous les autres extraits végétaux ayant de très faibles activités, l'influence des agents activateurs est dérisoire. Ces nouvelles données confirment donc nos résultats antérieurs, à savoir qu'il faudra impérativement envisager des essais d'extraction/purification enzymatiques à partir de ces extraits bruts d'ananas «artisansaux» fournis par le CIRAD/Flhor.

C. TEST D'ACTIVITE LIPOLYTIQUE

Nous avons voulu tester l'activité lipolytique des latex de *C. papaya* ainsi que des extraits végétaux d'*A. comosus*. Cette activité hydrolytique a été testée dans un milieu réactionnel hétérogène eau/lipide, en utilisant un substrat lipidique naturel : la tributyrine (Tri C4:0). Le titrage des acides gras libres (AGL) libérés est réalisé par titrimétrie à pH-Stat. Les valeurs d'activités lipolytiques (A_L) qui correspondent aux vitesses initiales des cinétiques enzymatiques, sont calculées par régression polynomiale (second degré) des courbes d'hydrolyse enzymatique. Elles sont exprimées en unités internationales (UI) par gramme de préparation enzymatique. Une UI correspond à une micro-mole (μmol) d'AGL libérés par minute. Cependant, il a fallu au préalable établir les conditions optimales d'hydrolyse enzymatique de la tributyrine par les lipases du latex de *C. papaya* et celles des extraits d'*A. comosus*. Ces conditions optimales de lipolyse enzymatique ont été définies sur le

latex brut de *C. papaya* (papaïne 'crude powder') commercialisé par Sigma, ainsi que sur le lot commercial de bromélaïne de Sigma (rachis d'*A. comosus*).

C - 1 / Conditions optimales pour la détermination des activités lipolytiques.

La standardisation des conditions opératoires est très importante dans le cas des déterminations d'activités enzymatiques ; tous les facteurs qui influent sur l'activité devront être soigneusement définis si l'on veut faire des comparaisons d'activités entre divers échantillons. Par conséquent, les comparaisons d'activités lipolytiques ne peuvent s'effectuer qu'avec des données obtenues sous des conditions réactionnelles strictement identiques. La «qualité» de l'interface eau/lipide est de plus un paramètre à maîtriser impérativement lorsque des enzymes lipolytiques sont mis en œuvre.

Les paramètres expérimentaux qui ont été pris en compte pour la détermination de ces conditions optimales sont la température d'hydrolyse, le pH d'hydrolyse, la teneur en substrat, la quantité de préparation enzymatique ajoutée et le temps d'incubation. Ces différents paramètres influencent considérablement les cinétiques d'hydrolyse des TAGs par les lipases. Chaque lipase possède une zone de pH et de température, parfois étroite, pour laquelle son activité est maximale. Les teneurs en substrat et en enzyme influent aussi sur cette activité. Par exemple, l'étude des cinétiques enzymatiques doit s'effectuer avec un excès de substrat dans le milieu réactionnel. De même qu'il faut travailler avec de faibles concentrations en enzyme de telle manière que la formation du complexe enzyme-substrat [ES] ne modifie pas ou peu la concentration en substrat. Le temps d'incubation est aussi un paramètre à prendre en compte sur la détermination de l'activité lipolytique, car cette mesure ne peut s'effectuer que lorsque la vitesse de réaction (V_r) demeure constante ce qui implique de travailler aux vitesses initiales (V_o).

➤ Teneur en substrat :

La mesure de l'activité lipolytique doit s'effectuer dans des conditions saturantes en substrat (forte concentration sans toutefois inhiber l'enzyme : $[S] \geq 10 K_m$). Cette teneur en substrat influence aussi considérablement la qualité de l'interface eau/lipide, qui joue un rôle primordial dans la catalyse enzymatique des TAGs par les lipases. On se propose par conséquent d'étudier la variation de l'activité lipolytique du latex brut de *C. papaya* (papaïne

‘crude powder’) commercialisé par Sigma en fonction de la teneur en tributyrine employée (figure 1).

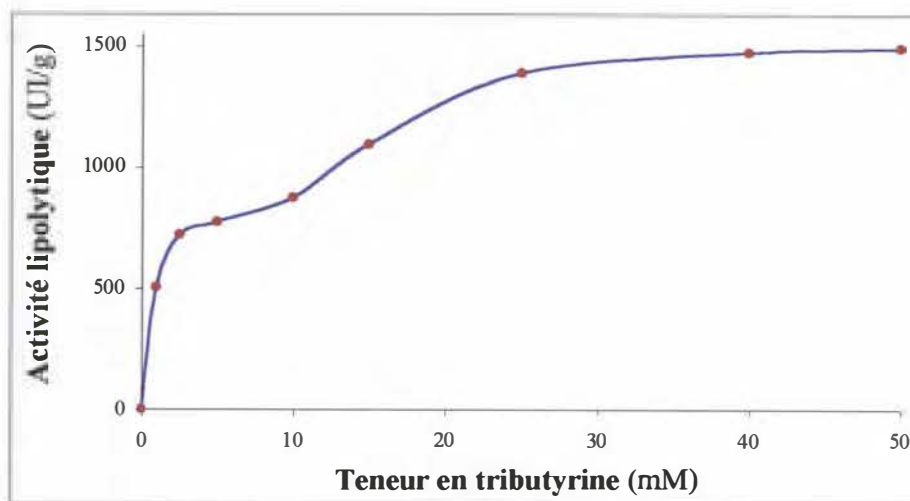


Figure 1 : Détermination de la valeur saturante en tributyrine lors de son hydrolyse par le latex brut de *C. papaya* (Sigma).

Ces résultats mettent en évidence le caractère hétérogène de cette catalyse enzymatique qui a lieu à l'interface eau/lipide. Nous notons en effet une première augmentation de l'activité lipolytique pour des concentrations croissantes en substrat, jusqu'à atteindre la limite de solubilité de celui-ci dans l'eau (3-5mM). Puis au-delà de cette concentration, une seconde augmentation de l'activité lipolytique est observée jusqu'à la saturation de l'enzyme par le substrat (40-50mM). Ces lipases qui agissent sur des TAGs non solubles dans l'eau, n'ont donc pas un comportement de type michaélien et n'obéissent pas à la cinétique michaélienne classique. Une détermination du K_m et de la vitesse maximale (V_m) par des équations cinétiques classiques et notamment une représentation en double inverse de Lineweaver-Burk, ne peut être réalisée pour ce type d'enzymes. Il faudrait faire intervenir d'autres facteurs physiques ayant trait au milieu dans lequel l'hydrolyse a lieu, c'est-à-dire un milieu de type «émulsion». Nous avons donc déterminé graphiquement cette valeur saturante en substrat, qui vraisemblablement se situe aux alentours de 40mM. A partir de cette concentration, la vitesse d'hydrolyse tend vers la vitesse maximale et l'activité lipolytique est optimale. Les déterminations d'activité lipolytique des latex de *C. papaya* ainsi que des extraits d'*A. comosus* seront réalisées avec cette teneur saturante en substrat.

► **Teneur en enzyme :**

Nous avons voulu déterminer la teneur adéquate en extrait brut végétal à utiliser lors des tests d'activités lipolytiques. Les lipolyses ont donc été réalisées sur de la tributyrine avec des teneurs croissantes en enzyme : de 5 à 150mg pour les 450mg de substrat (soit un rapport biocatalyseur/substrat de 1% à 33% p/p). Nous nous sommes «cantonnés» à cette gamme classique de teneur en enzyme et pour des raisons d'imprécision de mesure nous ne sommes pas descendus non plus en dessous de 5mg de pesée. La détermination de la teneur adéquate en enzyme pour le latex brut de *C. papaya* (papaine 'crude powder' - Sigma) lors de l'hydrolyse enzymatique de la tributyrine, est indiquée dans le tableau IV et sur la figure 2. La variation de la vitesse initiale d'hydrolyse de la tributyrine est déterminée en fonction de la teneur en enzyme ajoutée.

Tableau IV : Résultats d'hydrolyse de la tributyrine par le latex brut de C. papaya de Sigma.
(pH 8,0 ; T = 45°C ; S = 1,5 mmoles soit 450 mg; Temps d'incubation = 10 minutes)

Biocatalyseur (mg)	0	5	15	30	60	90	120	150
biocatalyseur / substrat (en % pondéral)	0,0	1,1	3,3	6,7	13,3	20,0	26,7	33,3
C4:0 libérés (µmol.min ⁻¹)	-	7 435	15 525	27 300	52 320	72 180	88 080	105 000
Act. lipolytique (UI / g)	-	1487	1035	910	872	802	734	700

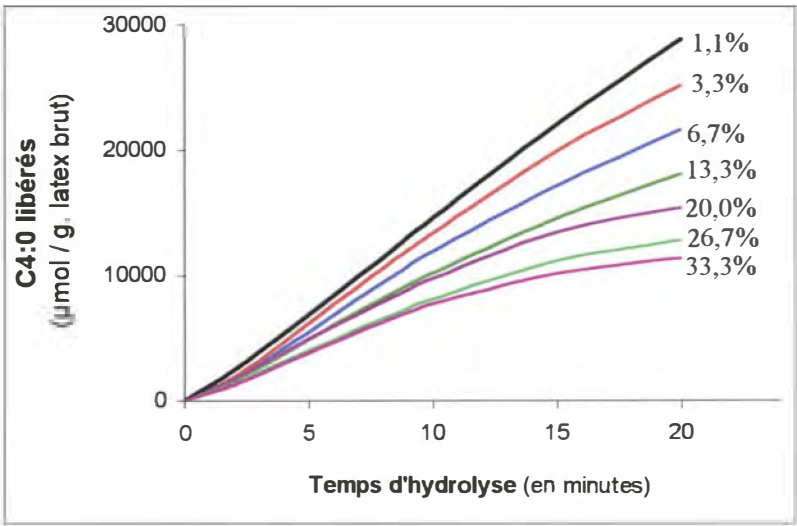


Figure 2 : Détermination de la teneur adéquate en enzyme lors de l'hydrolyse de la tributyrine par le latex brut de C. papaya (Sigma)

Le pourcentage pondéral «extrait brut végétal / substrat » adéquat est d'environ 1% (p/p) sur la gamme étudiée en enzyme. En effet, avec des teneurs supérieures, la quantité d'acides butyriques libérés par minute et par gramme de préparation enzymatique diminue

fortement. Le pourcentage pondéral adéquat pour l’hydrolyse de la tributyrine par le lot de bromélaïne (rachis d'*A. comosus*) commercialisée par Sigma est indiqué dans le tableau V et à la figure 3.

Tableau V : Résultats d'hydrolyse de la tributyrine par le lot de bromélaïne de Sigma.

(pH 8,0 ; T = 50 °C ; S = 1,5 mmoles soit 450 mg; Temps d'incubation = 10 minutes)

Biocatalyseur (mg)	0	5	15	30	60	90	120	150
Enz. / Substrat (%p/p)	0,0	1,1	3,3	6,7	13,3	20,0	26,7	33,3
C4:0 libérés (μmol.min ⁻¹)	-	365	570	840	1 560	2 160	2 640	3 150
Act. lipolytique (UI / g)	-	73	38	28	26	24	22	21

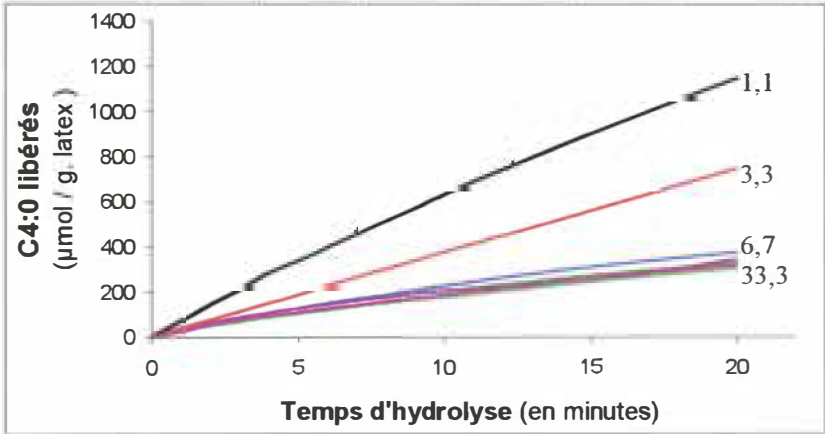


Figure 3 : Détermination de la teneur adéquate en enzyme lors de l’hydrolyse de la tributyrine par le lot de bromélaïne de Sigma.

Dans la gamme étudiée en enzyme, nous avons aussi l'optimum de l'activité lipolytique avec une teneur en biocatalyseur d'environ 1% (p/p) par rapport au substrat.

➤ pH et température d'hydrolyse :

L'activité des lipases en hydrolyse varie fortement en fonction des paramètres du milieu (pH, température,...). Le pH optimal d’hydrolyse de la tributyrine par les lipases du latex de *C. papaya* est de 8,0 - 9,0 [Giordani *et al*, 1991]. Au-delà de ces limites de pH, l'activité lipasique diminue fortement (il ne reste plus que 80% du maximum d’activité à pH 10,0 et 20% à pH 11,0). Les déterminations d'activité lipolytique des latex bruts de *C. papaya* ont donc été réalisées au pH optimal stationnaire de 8,0. Il en va de même pour la détermination des activités lipolytiques des extraits bruts d'*Ananas comosus*. L’activité lipolytique des lipases varie avec la température du système mais aussi et surtout avec le couple température/durée d’incubation. L’un ne va pas sans l’autre et comme pour tout traitement thermique, il est impératif de préciser la notion de durée d’application de la température en question. Pour la détermination de la température d’hydrolyse dite optimale,

en réalité il s'agit de la température du système engendrant l'activité lipolytique maximale dans les conditions opératoires précédemment établies (pH 8,0, 10 minutes de temps d'incubation,...). La recherche de cette température optimale est réalisée par la mesure des variations de la vitesse initiale d'hydrolyse de la tributyrine par le latex brut de *C. papaya* (papaine 'crude powder' - Sigma) en fonction de la température du système (figures 4 et 5).

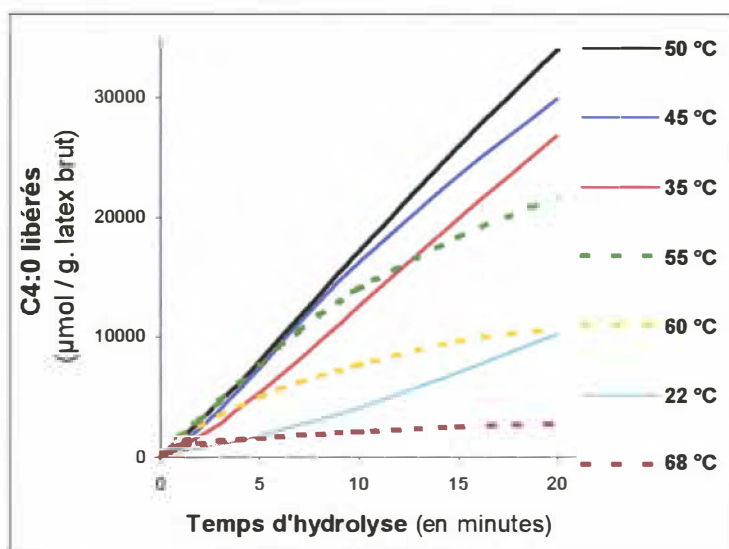


Figure 4 : Evolution de l'hydrolyse de la tributyrine par le latex brut de *C. papaya* (Sigma) en fonction de la température du système

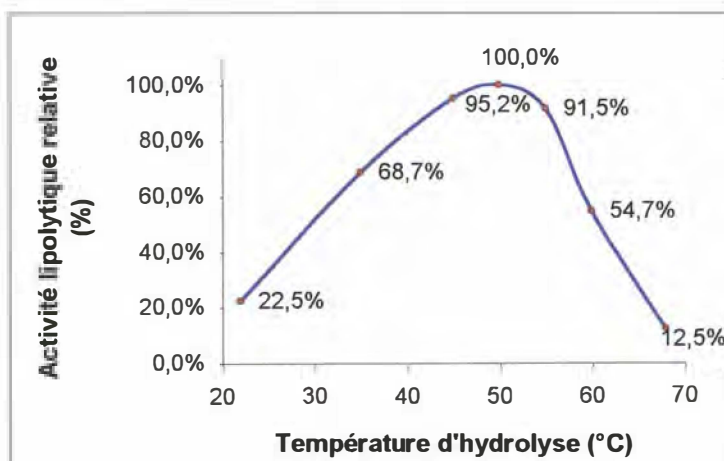


Figure 5 : Détermination de la température optimale d'hydrolyse de la tributyrine par le latex brut de *C. papaya* (Sigma)

La température optimale d'hydrolyse de la tributyrine par le latex brut de *C. papaya* (papaine 'crude powder' - Sigma) est de 50°C pour un temps d'incubation allant jusqu'à 20 minutes. Ces résultats sont complémentaires avec ceux trouvés par Giordani *et al* (1991) qui ont démontré que pour un TAG donné, une augmentation de la température d'hydrolyse (25°C → 37°C → 55°C) permet d'accroître le taux d'hydrolyse initiale du substrat par les lipases du latex de *C. papaya*. D'un point de vue fondamental, cette température dite optimale

n'est pas une caractéristique précise de ce couple enzyme/substrat car celle-ci peut varier considérablement avec quelques modifications des conditions opératoires et notamment avec le temps d'incubation. Elle permet cependant de se faire une idée sur le caractère plus ou moins thermolabile de ces lipases. D'après les résultats, les lipases du latex de *C. papaya* semblent être relativement thermorésistantes en hydrolyse car l'activité demeure optimale et constante à 50°C jusqu'à 20 minutes d'hydrolyse. A 55°C, nous observons une perte d'activité qu'à partir de 5 minutes d'incubation. Cette chute d'activité est ensuite accentuée avec des températures supérieures (en raison de la dénaturation thermique des enzymes). L'énergie d'activation thermique (E_a) de cette réaction de lipolyse peut être calculée selon l'équation d'Arrhénius : $k = Ae^{-E_a/RT}$. La valeur de E_a est de l'ordre de 15 kcal.mol⁻¹ pour l'hydrolyse de la tributyrine par le latex brut de *C. papaya* de Sigma (déterminée entre 22 et 35°C). Il n'en reste pas moins que la valeur ainsi déterminée est plus ou moins « biaisée », car dans le cas des enzymes et en particulier du fait de la dénaturation thermique, l'application de cette loi n'est qu'une vue approchée d'une réalité bien plus complexe ; on observe une variation de l'énergie d'activation en fonction de la température du système.

Les résultats concernant la détermination de la température optimale d'hydrolyse de la tributyrine par le lot de bromélaïne commercialisée par Sigma, sont répertoriés dans les figures 6 et 7 suivantes.

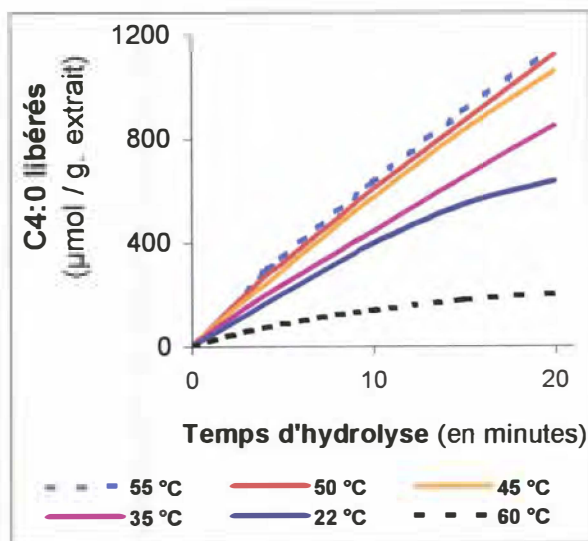


Figure 6 : Evolution de l'hydrolyse de la tributyrine par le lot de bromélaïne (Sigma) en fonction de la température du système.

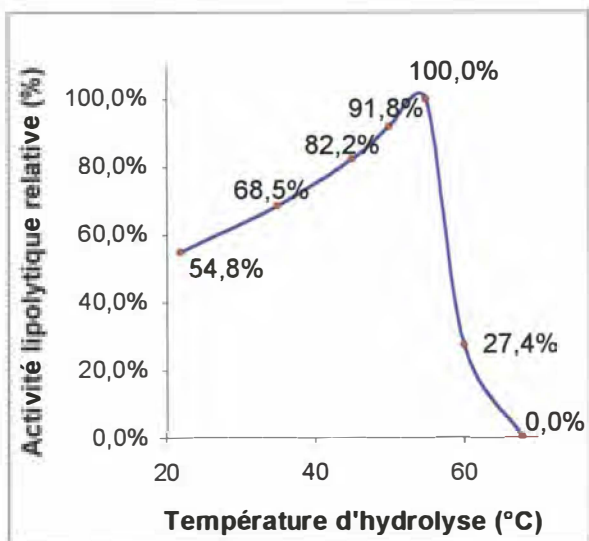


Figure 7 : Détermination de la température optimale d'hydrolyse par le lot de bromélaïne (Sigma)

La température optimale d'hydrolyse de la tributyrine par le lot de bromélaïne brute de Sigma est de 55°C. Pour des températures supérieures (60 et 68°C), l'activité lipolytique diminue brutalement. La valeur de E_a pour cette réaction est de l'ordre de 5 kcal.mol⁻¹.

➤ **Récapitulatif des conditions optimales d'hydrolyse :**

- Teneur en tributyrine : 1,5 mmole (\approx 450mg) dans 40 ml d'une solution aqueuse de NaCl 0,15 M (c'est-à-dire 40 mM de tributyrine dans le milieu réactionnel)
- Quantité de préparation enzymatique : 5 mg \approx 1% (p/p) par rapport au substrat
- Température d'hydrolyse : 50°C ; pH d'hydrolyse : 8,0
- Temps d'incubation : 10 minutes

C - 2 / Activités lipolytiques des latex de papaye.

Les valeurs d'activité lipolytique des divers lots de latex de *C. papaya* sont répertoriées dans le tableau VI. Les résultats correspondent aux moyennes arithmétiques de 3 séries d'analyses réalisées dans les mêmes conditions.

Tableau VI : Activités lipolytiques des lots de *C. papaya*.

Préparations enzymatiques	Activités lipolytiques (UI / g)	Activités résiduelles (%)
	Alip ^a \pm σ^b (σ^c)	
Papaïne raffinée : (Reco Industry Ltd.)	0 \pm 0 (0%)	Aucune activité
Papaïne hydrosoluble : (Merck)	0 \pm 0 (0%)	Aucune activité
Papaïne purifiée – validase : (Valley-Research Co.)	0 \pm 0 (0%)	Aucune activité
Papaïne brute 'crude powder' : (Sigma-Aldrich Ltd.)	1567 \pm 35 (2,3 %)	100 %
Latex brut – 1^{ère} incision		
■ Variété "MTQ2" : (Guadeloupe)	587 \pm 18 (3,0 %)	37 %
■ Variété "Deshaies" : (Guadeloupe)	814 \pm 38 (4,7 %)	52 %
■ Variété "Locale-parcelle38" : (Madagascar)	145 \pm 17 (11,8 %)	9 %
Latex brut – 2^{ème} incision		
■ Variété "Deshaies" : (Guadeloupe)	322 \pm 10 (3,1 %)	20 %
■ Variété "Locale-parcelle38" : (Madagascar)	68 \pm 5 (6,7 %)	4 %

^a moyenne d'activité (m) ; ^b écart-type (σ) ; ^c écart-type relatif (σ %).

Les activités sont calculées par pH-Stat avec la tributyrine à 50°C/10min. et à pH constant 8,0. Les réactions sont catalysées par 5mg de préparation enzymatique. Une U.I. correspond à 1 μ mol. d'AGL libérés par minute.

On note que pour les lots commerciaux de papaine raffinée ou purifiée (Reco Industries Ltd., Merck et Valley Research Co.), l'activité lipolytique est nulle. Cela semble logique puisque tous ces lots ont subi des étapes préalables de raffinage afin d'extraire et de concentrer au maximum les enzymes protéolytiques (et notamment la protéase 'papaine') dans l'extrait brut. De par les résultats, ces lots ne contiennent pas de lipases (*à priori* éliminées dans la fraction non soluble en phase aqueuse lors du traitement des latex). Ces résultats sont complémentaires avec ceux trouvés par Giordani *et al.* (1991) qui ont démontré que les deux protéases purifiées du latex de *C. papaya*, à savoir la papaine et la chymopapaine, sont incapables de catalyser des réactions de lipolyse ; de même que pour tous les autres constituants enzymatiques solubles en phase aqueuse. Seul le latex brut de papaye agit comme biocatalyseur de cette lipolyse, indiquant vraisemblablement que l'activité lipolytique est associée aux particules non solubles du latex.

Le latex brut de *C. papaya* commercialisé par Sigma est le meilleur biocatalyseur pour cette hydrolyse (1567 UI/g) mais les latex provenant de la variété "MTQ2" (587 UI/g) et de la variété "Deshaies" (322-814 UI/g) de Guadeloupe, présentent également de bonnes activités lipolytiques même si ces dernières restent inférieures à celle du latex brut commercialisé par Sigma. Les latex de papaye provenant de la variété locale de Madagascar présentent de très faibles activités lipolytiques (dans le meilleur des cas, l'activité ne représente que 9% de celle du lot de papaine 'crude powder' commercialisé par Sigma). Comme dans le cas des activités protéolytiques, toutes les variétés de papayer originaires de Guadeloupe (MTQ2, Deshaies, ...) ont des latex de qualité lipasique supérieure à celle des latex originaires de Madagascar. Les teneurs en eau de ces derniers latex (présentant les plus faibles activités) ne semblent pas indiquer une dénaturation thermique de ces matières végétales, ce qui élimine l'hypothèse d'une technologie de séchage mal employée pour ces latex de Madagascar. Là aussi, les résultats semblent *à priori* indiquer que le facteur primordial serait la localisation géographique des cultures et non la variété de papayer employée. Pour vérifier cette hypothèse, il serait judicieux de déterminer la variété de papayer utilisée dans le lot commercial de Sigma présentant la plus forte activité lipolytique (par des techniques de biologie moléculaire sur des traces d'ADN présents dans ce lot) et d'implanter cette variété en Guadeloupe. Cela permettra de vérifier si cette supériorité de «qualité lipasique» (en terme d'activité) provient réellement de la localisation géographique des cultures ou de la variété employée. On constate aussi que pour chaque variété étudiée de papayer, l'activité lipolytique varie énormément en fonction de la fréquence des saignées ; les latex récoltés lors de la

2^{ème} saignée (à 5 jours d'intervalle de la 1^{ère}) présentent des activités lipolytiques beaucoup plus faibles. La perte d'activité entre ces deux saignées peut atteindre 50 à 60%. Ce "second" latex contient donc vraisemblablement moins de lipases. En conclusion, les premières incisions de latex provenant des deux variétés de papayers originaires de Guadeloupe peuvent être avantageusement exploitées à l'échelle industrielle, pour entre autres des réactions de lipolyse enzymatique (hydrolyse de TAGs et/ou modification de la composition en AG d'une large gamme d'huiles et de graisses).

Lors de ces lipolyses enzymatiques, nous avons également testé l'effet d'agents réducteurs (à faibles poids moléculaires) tels que le DTT et le β -mercaptoéthanol sur l'activité lipolytique du latex brut de *C. papaya* (papaïne 'crude powder' - Sigma). En effet, pour que l'activité enzymatique d'un biocatalyseur donné soit optimale, le site actif de l'enzyme doit se trouver dans sa configuration la plus active possible. Les agents réducteurs de ce type permettent de rompre les ponts disulfures de l'enzyme et de remédier à l'éventuelle oxydation par l'air. Cependant, les résultats obtenus sont apparus peu significatifs. En résumé, nous n'avons obtenu qu'environ 7 à 10% d'augmentation de l'activité lipolytique pour une certaine teneur en ces composés dans le milieu réactionnel : 4mM de DTT ou 5mM de β -mercaptoéthanol. Sinon, au-delà de ces teneurs, nous avons observé une nette inhibition de l'activité lipolytique. L'influence de l'EDTA (agent chélateur) sur l'activité lipolytique des lipases du latex de *C. papaya* n'a pas été étudiée dans ces travaux. En effet, Giordani *et al* (1991) ont déjà montré que cet agent (avec une teneur de 100mM dans le milieu réactionnel), ainsi que les agents sulphydryles du type 5,5'-dithiobis-(acide-2-nitro-benzoïque) ou dodecyl-dithio-5-(acide-2-nitro-benzoïque) inhibent l'activité lipolytique de ces lipases. De plus, l'addition de sels de calcium (Ca^{2+}) à 100mM dans le milieu réactionnel ne permet pas de restituer l'activité lipolytique initiale de ces lipases de *C. papaya*. Ces expérimentations indiquent bien le fait que le mode d'action des lipases du latex de *C. papaya* est totalement différent de celui des thiol-protéases (papaïne, chymopapaïne, ...) de ce même latex.

C - 3 / Activités lipolytiques des extraits d'ananas.

Les valeurs d'activité lipolytique des divers extraits d'ananas sont répertoriées dans le tableau VII. Les résultats correspondent aux moyennes arithmétiques de 3 séries d'analyses réalisées dans les mêmes conditions.

Tableau VII : Activités lipolytiques des différents extraits d'*Ananas comosus*

Préparations enzymatiques	Activités lipolytiques (UI / g)			
	Alip n°1	Alip n°2	Alip n°3	Ap ^a ± σ ^b (± σ %)
Bromélaïne (rachis d'ananas) : (Sigma-Aldrich Ltd.)	68	64	69	67 ± 3 (3,9 %)
Rachis broyés d'ananas : (CIRAD/FIhor, Guadeloupe)	45	48	51	48 ± 3 (6,9 %)
Feuilles broyées d'ananas : (CIRAD/FIhor, Guadeloupe)	38	35	32	35 ± 3 (8,6 %)
Racines broyées d'ananas : (CIRAD/FIhor, Côte d'Ivoire)	43	40	45	43 ± 3 (5,9 %)
Jus de racines d'ananas : (CIRAD/FIhor, Côte d'Ivoire)	12*	8*	14*	11* ± 3* (27,0 %)

^a moyenne d'activité (m) ; ^b écart-type (σ) ; ^c écart-type relatif (σ %).

Les activités sont calculées par pH-Stat avec la tributyrine à 50°C/10min. et à pH constant 8,0. Les réactions sont catalysées par 5mg de préparation enzymatique (* sauf pour le jus de racines d'ananas où les réactions ont été catalysées par 50µL de jus brut : les activités sont exprimées en *UI/mL de jus). Une U.I. correspond à 1µmol. d'AGL libérés par minute.

On constate que le lot commercial de bromélaïne de Sigma présente la meilleure activité lipolytique. Cependant, les activités lipolytiques déterminées pour les différents extraits bruts d'ananas (et même pour cette préparation commerciale) demeurent très faibles (<70 UI/g) avec la tributyrine comme substrat d'hydrolyse. Il faudra par la suite tester ces activités lipolytiques avec d'autres substrats d'hydrolyse afin de vérifier l'éventuelle typosélectivité de ces lipases d'ananas (qui *à priori* sont présentes dans les extraits bruts du fait que ces derniers présentent des activités lipolytiques ; activités certes faibles mais réelles).

C - 4 / Typosélectivité des lipases de papaye et d'ananas en hydrolyse.

L'utilisation des enzymes devient de plus en plus importante dans bon nombre d'applications industrielles (pharmaceutique, agro-alimentaire, cosmétique,...). Les enzymes végétales présentent un avantage par rapport aux enzymes issues du règne animal ou microbien en raison de leurs disponibilités, de leurs facilités d'extraction ou de purification, ainsi que de leurs sélectivités particulières. Par exemple, de nombreuses lipases ont été étudiées pour leurs "typosélectivités", c'est-à-dire leurs sélectivités pour un AG particulier ou un type de famille d'AGs (courts, longs, saturés, insaturés, etc.). La lipase du latex de *C. papaya* est un exemple typique. En effet, Giordani *et al.* (1991) ont démontré que cette lipase possède une préférence pour les AGs à courtes chaînes lors de l'hydrolyse des TAGs homogènes. Ensuite la forte *sn*-3 stéréosélectivité de cette lipase en hydrolyse a été démontrée

par Villeneuve *et al.* (1995) selon la méthode basée sur l'hydrolyse enzymatique des TAGs mixtes chiraux et de leurs racémiques.

Dans la continuité des travaux précédents, nous avons voulu déterminer l'activité lipolytique ainsi que l'éventuelle typosélectivité des lipases contenues dans les extraits d'*A. comosus* lors de l'hydrolyse de divers TAGs homogènes et ce en comparaison avec une préparation commerciale de latex brut de *C. papaya*. Cette détermination de la typosélectivité des lipases lors de l'hydrolyse de TAGs homogènes a aussi été réalisée avec un latex brut récolté à partir des tiges d'une Euphorbiacées, *Euphorbia characias* (récolté à Montpellier). Cette plante fournit en effet un latex dont l'activité lipolytique a déjà été mise en évidence par Giordani *et al.* (1991) lors de l'hydrolyse enzymatique de la tributyrine. Ce latex pourrait éventuellement être un biocatalyseur potentiel pour des réactions de biofaçonnement des corps gras.

Les réactions d'hydrolyse enzymatiques sont menées dans des conditions optimales avec comme substrat : différents TAGs homogènes (pureté > 99%) ainsi que divers mélanges de TAGs mixtes naturels (c'est-à-dire des TAGs d'huiles végétales commerciales principalement). L'évolution des activités lipolytiques selon la nature du substrat à hydrolyser (longueur de chaînes, nombre d'insaturation,...) permettra d'évaluer la typosélectivité de ces lipases en hydrolyse. Cependant, ce qu'il faut impérativement avoir à l'esprit, c'est que la typosélectivité des lipases en hydrolyse ne dépend pas que de l'enzyme lui-même, mais aussi de l'état physique du substrat et plus précisément de la qualité de l'interface lipide/eau. Par conséquent, pour ces déterminations, il est essentiel de mener les réactions d'hydrolyse dans des conditions où tous les substrats sont dans le même état physique. Dans nos conditions expérimentales, nous avons utilisé que des substrats liquides à la température d'hydrolyse (50°C) à savoir la tributyrine, la tricaproïne, la tricapryline, la tricaprène et la trioléïne pour les TAGs homogènes. Les divers mélanges de TAGs mixtes naturels (TAGs de coprah, TAGs d'olive, TAGs de tournesol et TAGs de lin) sont évidemment liquides à cette température.

Diverses courbes de cinétiques sont obtenues par pH-Stat (pH 8,0 et 50°C) à partir de l'hydrolyse de ces différents substrats par la préparation commerciale de bromélaïne (Sigma), le latex brut de *Carica papaya* (lot de papaine 'crude powder' de Sigma) ainsi que le latex brut d'*Euphorbia characias* (latex frais récolté à Montpellier). Les réactions sont catalysées par 5mg de préparation commerciale de bromélaïne (*A. comosus*) ou de papaine (*C. papaya*) ;

pour les réactions catalysées par le latex frais d'*E. characias*, un volume de 10µL de latex frais a été ajouté. Les activités lipolytiques des trois préparations enzymatiques végétales sont déterminées par régression polynomiale (du second degré) sur les dix premières minutes de réaction. Ces valeurs d'activités sont répertoriées dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Activités lipolytiques des latex bruts de C. papaya et d'E. characias ainsi que des rachis d'A. comosus (évaluation de leurs typosélectivités en hydrolyse).

	Activités lipolytiques (UI / g)		
	Latex d' <i>E. characias</i> (récolté à Montpellier)	Rachis d' <i>A. comosus</i> (bromélaïne - Sigma)	Latex de <i>C. papaya</i> (papaine'crude powder' Sigma)
Substrats d'hydrolyse :			
Tributyryne	3500* (=10295**)	64 ± 3 (4,7 % ^b)	1590 ± 33 (2,1 % ^b)
Tricaproïne	950* (=2795**)	45 ± 3 (6,7 % ^b)	1350 ± 29 (2,1 % ^b)
Tricapryline	835* (=2456**)	51 ± 3 (5,9 % ^b)	1080 ± 25 (2,3 % ^b)
Tricaprine	470* (=1382**)	41 ± 3 (7,3 % ^b)	1050 ± 27 (2,6 % ^b)
TAG de coprah	220* (=647**)	42 ± 3 (7,1 % ^b)	590 ± 18 (3,0 % ^b)
Trioléine	44* (=129**)	42 ± 4 (9,5 % ^b)	55 ± 4 (7,2 % ^b)
TAG d'olive	34* (=100**)	42 ± 3 (7,1 % ^b)	68 ± 5 (7,3 % ^b)
TAG de tournesol	48* (=141**)	49 ± 4 (8,2 % ^b)	56 ± 4 (7,1 % ^b)
TAG de lin	27* (=79**)	63 ± 4 (6,3 % ^b)	52 ± 5 (9,6 % ^b)

* UI/ml de latex frais (**correspondance en UI/g. d'extrait sec de latex)

Les autres activités sont exprimées en UI/g de préparation enzymatique. Une U.I. correspond à 1µmol. d'AGL libérés par minute. Les résultats sont les moyennes de 3 séries de mesure :

^a moyenne d'activité, ^b écart-type; ^c écart-type relatif (%).

Les résultats indiquent que la préparation commerciale de bromélaïne de Sigma (rachis d'ananas) exprime une très faible activité lipolytique pour tous les TAGs testés, en comparaison avec le latex brut d'*Euphorbia characias* et celui de *Carica papaya*. De par ces faibles activités lipolytiques, nous ne pouvons pas établir une typosélectivité précise de ces lipases d'*A. comosus* ; pour tous les TAGs testés, l'activité lipolytique est optimale avec la tributyrine (64 UI/g) et les TAGs de lin (63 UI/g). A notre connaissance, c'est la première fois qu'une étude traite de la "véritable activité lipolytique" de cette préparation de bromélaïne avec des authentiques TAGs qui sont les substrats naturels des lipases. Cette activité lipolytique, même si elle est faible, existe et a été quantifiée pour la première fois avec différents substrats. Ces résultats sont complémentaires avec ceux obtenus par Mukherjee *et al.* (1998) dans lesquels l'activité lipasique d'une préparation commerciale de

bromélaïne a été quantifiée non pas dans des réactions d'hydrolyse, mais dans des réactions d'estérification de divers AGs avec du *1*-butanol. Ces auteurs ont démontré que cette préparation enzymatique végétale possède une activité lipasique (ou estérasique du moins) car celle-ci pouvait catalyser cette réaction d'estérification : d'où présence de lipases !

Par conséquent, nous pensons que ces deux résultats sont vraiment très complémentaires, étant donné que notre étude porte sur l'activité lipolytique de cette préparation de bromélaïne sur des TAGs naturels. Il est primordial de garder à l'esprit qu'avec une même lipase, l'activité lipasique en hydrolyse et en estérification peut être véritablement différente. Une préparation lipasique peut par exemple avoir une forte activité d'estérification et exprimer indifféremment une forte ou faible activité hydrolytique (Muderwha *et al.*, 1988). Dorénavant, nous pouvons affirmer que la préparation commerciale de bromélaïne semble contenir des lipases exprimant une forte activité d'estérification (d'après Mukherjee *et al.*) et une très faible activité hydrolytique, du moins dans nos conditions d'hydrolyse.

Le latex brut d'*Euphorbia characias*, qui contient 340mg de matière sèche par millilitre de latex frais (selon la détermination de la teneur en extrait sec à 103°C pendant 24h.), exprime quant à lui une très forte activité lipolytique. Pour tous les TAGs testés, ce latex présente une meilleure activité que le latex brut de *C. papaya*. Par exemple, l'activité lipolytique avec la tributyrine comme substrat est de 3500 UI/mL de latex frais d'*E. characias* (soit 10295 UI/g d'extrait sec de latex), contre seulement 1590 UI/g pour le latex brut de *C. papaya*. De plus, lors de l'hydrolyse de ces TAGs homogènes, les lipases d'*E. characias* semblent posséder une préférence pour les AGs à courtes chaînes. En effet, l'activité lipolytique est optimale avec la tributyrine et les activités diminuent considérablement avec les longueurs de chaîne des TAGs. Avec la tricaproïne et la tricapryline, ces lipases n'expriment plus que 25% d'activité relative comparée à celle obtenue avec la tributyrine ; avec la tricapriline, ces lipases expriment 13% de cette activité relative, 6% avec les TAGs de coprah et finalement 1% d'activité relative avec les TAGs à longues chaînes (AGs ≥ 18 carbones). Cependant, cette sélectivité particulière des lipases d'*E. characias* devra être confirmée dans des réactions d'hydrolyse de TAGs mixtes chiraux et de leurs racémiques, selon la méthode développée par Villeneuve *et al.* (1995).

Cette forte activité lipolytique des lipases d'*E. characias* ainsi que leurs sélectivités particulières en hydrolyse enzymatique, pourraient être avantageusement exploitées à l'échelle industrielle. Ces lipases pourraient par exemple être employées dans l'industrie agro-alimentaire afin d'obtenir des produits avec des saveurs particulières, notamment par l'élimination des AGs à courtes ou moyennes chaînes dans la matière grasse laitière. De plus, si ces lipases d'*E. characias* expriment une activité aussi forte lors des réactions classiques de biofaçonnement des corps gras (acidolyse, transestérification, interestérification,...), ce latex brut présenterait un fort potentiel comme biocatalyseur pour ce type de réaction de synthèse lipidique. Les lipases de ce latex pourraient notamment permettre de modifier la distribution glycéridique de diverses huiles et graisses, dans le but d'obtenir de nouveaux produits avec des propriétés physiques et chimiques prédéfinies (modification de la composition en AG ou la distribution des TAGs,...).

D. TEST D'ACTIVITE ACYLTRANSFERASIQUE

Selon la nature du substrat et les conditions opératoires de la réaction enzymatique mise en œuvre, des enzymes peuvent agir à l'inverse de leur réaction biologique de référence et même sur des substrats différents. Ce qui est notamment le cas des lipases, qui dans des conditions de synthèses enzymatiques (milieu solvant ou milieu lipidique fondu) peuvent effectuer des transferts d'acyles entre divers corps gras. L'intérêt des lipases n'est donc pas seulement d'hydrolyser les lipides dans le tractus intestinal comme les lipases pancréatiques, elles peuvent constituer en effet de bons biocatalyseurs pour l'acylation ou la déacylation d'une large gamme de substrats naturels ou synthétiques. De plus, les transformations catalysées par ces lipases, généralement très thermostables, s'opèrent habituellement avec une forte stéréo- et/ou régiosélectivité.

Ces enzymes et plus particulièrement les lipases d'origine végétale prennent un essor industriel considérable du fait qu'elles représentent actuellement des biocatalyseurs adéquats pour des réactions de biofaçonnement des corps gras. Afin d'évaluer le potentiel biocatalytique des lipases du latex de *C. papaya* et des extraits végétaux d'*A. comosus* lors des réactions classiques de biofaçonnement des corps gras, nous avons déterminé leurs activités spécifiques de transestérification (AST) selon la méthode préalablement mise au point par Graille *et al.* (1887) et Muderhwa *et al.* (1988).

D – 1 / Activité spécifique de transestérification.

Lors d'une réaction de transestérification enzymatique, les enzymes catalysent des transferts d'acyles entre des TAGs et des esters d'AGs. Pour cette détermination de l'AST, les auteurs ont mis au point un système qui utilise comme substrat des TAGs de coprah et du stéarate de méthyle dans un rapport molaire adéquat (20/1, mol/mol). Les réactions sont biocatalysées par les diverses préparations enzymatiques (10% p/p par rapport aux composés lipidiques totaux). Ces réactions sont menées à 50°C et en milieu lipidique fondu (c'est-à-dire sans solvant).

Lors de ces réactions enzymatiques, le degré d'incorporation de l'acide laurique (C12:0), AG majoritaire de l'huile de coprah et donc AG traceur de la réaction, dans la fraction « esters méthyliques d'acides gras (EMAG) » rend compte de l'activité de transestérification du biocatalyseur étudié pour les deux substrats lipidiques initiaux. Le suivi de l'incorporation du C12:0 est réalisé par chromatographie en phase gazeuse (CPG) après séparation des EMAG par chromatographie sur couche mince (CCM) de silice. En cours de réaction, la teneur en C12:0 va progressivement augmenter et ceci jusqu'à atteindre à l'équilibre 32 moles % par rapport aux AGs totaux, comme l'on parfaitement déterminé Graille *et al.* (1887) et Mudherwa *et al.* (1988). Ce pourcentage théorique « a » de C12:0 incorporé à l'équilibre dans la fraction EMAG a été calculé d'après la formule mathématique suivante : $a = [(32,8 \times 2) \times 20] / [(200 \times 20) + 100] = 0,32 = 32 \text{ moles\%}$ à l'équilibre.

Si « x » correspond au pourcentage molaire expérimental de C12:0 incorporés dans la fraction EMAG à un temps t considéré, alors le rapport « x/a » correspondra au taux de conversion (%Conv) à ce temps t considéré. Dans cette étude, l'AST est exprimée en fonction du nombre de μmoles de C12:0 incorporées dans la fraction EMAG par heure et par gramme de biocatalyseur et correspond à la vitesse initiale de la réaction de transestérification.

Le suivi de l'incorporation du C12:0 dans la fraction EMAG durant la réaction de transestérification biocatalysée par le latex brut de *C. papaya* (papaïne 'crude powder') commercialisé par Sigma est indiqué à la figure 8.

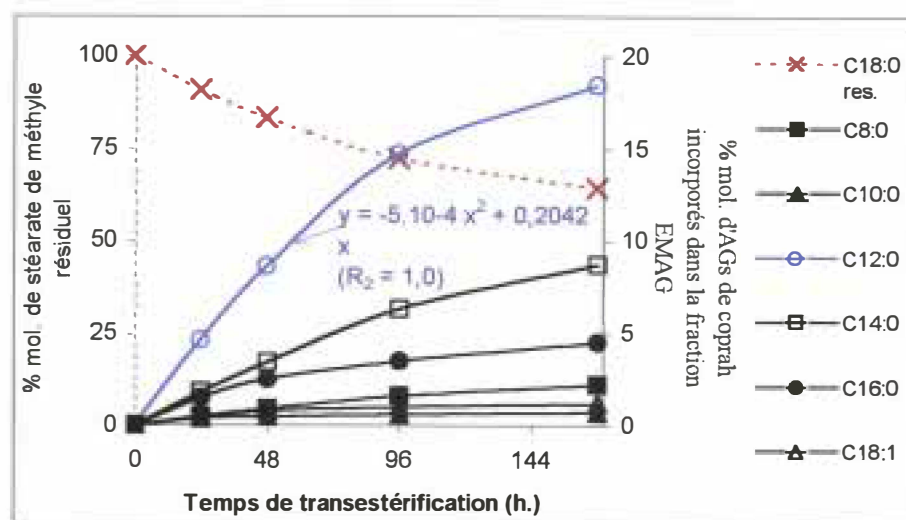


Figure 8 : Suivi de l'incorporation des AGs de coprah dans la fraction EMAG lors de la réaction de transestérification biocatalysée par le latex brut de *C. papaya* (Sigma).

La vitesse initiale de cette réaction de transestérification enzymatique est déterminée par régression polynomiale (second degré) de la courbe d'incorporation du C12:0 pendant les 48 premières heures de réaction ; durant cette période la stéréosélectivité de la lipase de *C. papaya* est conservée et la vitesse de réaction demeure linéaire. Les valeurs d'AST pour les différents latex bruts de *C. papaya* étudiés sont répertoriées dans le tableau IX (activités déterminées par régression polynomiale du second degré de la courbe d'incorporation du C12:0 en fonction du temps). Seuls ces latex bruts ont exprimés des activités de transferts d'acyles lors de ces réactions de transestérification enzymatique.

Tableau IX : Pourcentage de conversion et AST des différents latex bruts de *C. papaya*

Préparations enzymatiques	a _w	Taux de conversion (%)					AST*	
		Temps(h.)	0	24	48	96		168
Papaïne raffinée (Sigma) :	0.57		0,0	14,4	26,9	45,9	57,5	0,72
Latex brut – 1^{ère} incision								
■Variété “MTQ2” :	0.43		0,0	12,2	20,3	29,1	35,9	0,63
(Guadeloupe)								
■Variété “Deshaies”:	0.70		0,0	9,7	15,3	21,9	29,7	0,51
(Guadeloupe)								
■Variété “Locale-parcelle38”:	0.45		0,0	6,8	9,7	11,9	13,8	0,37
(Madagascar)								
Latex brut – 2^{ème} incision								
■Variété “Deshaies”:	0.56		0,0	10,3	16,8	22,8	29,7	0,54
(Guadeloupe)								
■Variété “Locale-parcelle38”:	0.52		0,0	6,3	8,8	10,3	12,5	0,35
(Madagascar)								

* Les AST sont exprimées en μmol de C12:0 incorporées dans la fraction EMAG par heure et par gramme de biocatalyseur (transestérification avec TAGs de coprah + EM C18:0 ; 20/1, mol/mol)

Le latex brut de *C. papaya* commercialisé par Sigma-Aldrich Ltd. présente la meilleure activité de transestérification : AST = 0,72 unité. Le latex de *C. papaya* issu de la variété «MTQ2» de Guadeloupe présente une activité légèrement inférieure (AST= 0,63 unité) à celui du lot commercial. Cependant toutes les valeurs d'activités sont très faibles et restent inférieures à 1 unité, c'est-à-dire une μmol de C12:0 incorporée par heure et par gramme de biocatalyseur. Les différences d'activités ne sont pas significatives.

Nous avons donc mis au point une autre méthode pour déterminer indépendamment les activités de transferts d'acyles de ces extraits bruts végétaux de *C. papaya* et d'*A. comosus*, lors des réactions classiques de biofaçonnement des corps gras.

D – 2 / Activités acyltransférasiques lors des réactions classiques de biofaçonnement des corps gras.

Nous avons voulu établir un système simple de détermination de l'activité de transfert d'acyles des latex de *C. papaya* et des extraits végétaux d'*A. comosus* lors des réactions classiques de biofaçonnement des corps gras. Les trois réactions de synthèse enzymatiques ou de transacylation enzymatiques (transfert d'acyles entre divers corps gras) étudiées sont :

- *L'interestérification* (TAGs + TAGs)
- *La transestérification* (TAGs + esters d'AGs)
- *L'acidolyse* (TAGs + AGLs)

La réaction d'estérification enzymatique (alcools + AGLs) et celle d'alcoolyse (alcools + TAGs) n'ont pas été étudiées. Très souvent, le terme de « transestérification » regroupe les réactions de transacylation suivantes : l'alcoolyse ($\text{RCOOR}' + \text{R}''\text{OH}$), l'acidolyse ($\text{RCOOR}' + \text{R}''\text{COOH}$) et la véritable transestérification ($\text{RCOOR}' + \text{R}''\text{COOR}^*$). Dans la littérature, diverses méthodes sont employées pour déterminer l'activité d'interestérification. Par exemple, Villeneuve *et al.* (1995) ont évalué l'activité du latex brut de *C. papaya* lors d'une réaction d'interestérification, en suivant l'incorporation des TAGs néoformés (moles % dans la fraction triglycéridique totale) en fonction du temps de réaction. D'autres auteurs (Green *et al.*, 1998) ont récemment exprimé cette activité d'interestérification comme le nombre de μmoles de 1,2-dipalmityl-3-stearyl glycerol (PPS) formées dans le milieu réactionnel par minute et par gramme de biocatalyseur, lors d'une réaction d'acidolyse entre la tripalmitine (PPP) et l'acide stéarique (S). Pour être formel, ce n'est pas réellement une activité d'interestérification, c'est une activité de transfert d'acyles en acidolyse.

Afin d'évaluer indépendamment les activités d'interestérisation, d'acidolyse et de transestérisation des divers biocatalyseurs végétaux, nous avons mis en œuvre des mélanges réactionnels simples utilisant toujours un TAG homogène de référence : la trilaurine (Tri C12:0) qui est le TAG majoritaire de l'huile de coprah. Les réactions enzymatiques sont menées avec ce TAG de référence et d'autres substrats lipidiques donneurs d'acyles : la tricaprène (Tri C10:0) pour déterminer les activités d'interestérisation, l'acide caprique (AGL C10:0) pour les activités d'acidolyse et le caprate de méthyle (EM C10:0) pour les activités de transestérisation.

Les réactions sont biocatalysées par les divers latex de *C. papaya* et extraits végétaux d'*A. comosus* (10% p/p par rapport aux composés lipidiques totaux) à 50°C et en présence de *n*-hexane (10mL). Ces réactions enzymatiques sont menées durant 78 heures et le suivi analytique est réalisé par CPG en phase apolaire ; le fractionnement par CCM n'est plus nécessaire. Lors de ces diverses réactions de transacylation enzymatique on note d'une part la formation de nouveaux TAGs dans le milieu réactionnel et d'autre part la formation de glycérides partiels. Ces composés néoformés ont un temps de rétention (TR) et un nombre total de carbone (NC) différent des deux substrats initiaux et ils se visualisent par l'apparition de nouveaux pics en CPG ; car au temps initial nous n'avons que deux pics correspondant aux deux substrats initiaux. Pour ces trois réactions de transacylation enzymatiques, les glycérides partiels formés dans le milieu réactionnel regroupent surtout les diacylglycérols (DAGs) suivants :

- DAG de type CC ou dicapryl glycerol (NC= 20 ; TR= 7,93)
- DAG de type CLa ou capryl-lauryl glycérol (NC= 22 ; TR= 8,90)
- DAG de type LaLa ou dilauryl glycerol (NC= 24 ; TR= 9,87)

Le mécanisme de la réaction d'interestérisation fait qu'il n'y a pas d'échange de molécule d'eau et ne s'effectue que par transfert d'acyles entre les deux substrats initiaux. La présence de glycérides partiels dans le milieu réactionnel est due à la réaction compétitive d'hydrolyse enzymatique, générée par la présence d'eau initialement contenue dans le biocatalyseur employé (nécessaire cependant à sa configuration active). Les principaux paramètres du milieu qui régissent la réversibilité entre ces deux réactions enzymatiques, sont la teneur en eau et plus particulièrement l'activité de l'eau (a_w) du biocatalyseur qui chiffre le degré de «disponibilité» de l'eau. Si cette valeur d' a_w est trop faible, l'enzyme n'a pas une structure tridimensionnelle optimale et inversement si cette valeur est trop élevée, le milieu

réactionnel est proche d'un milieu aqueux d'où compétition entre la réaction de synthèse et celle inverse d'hydrolyse. Généralement, d'après divers travaux antérieurs (Ozenne, 1993), l' a_w adéquate pour les réactions d'interestérification biocatalysées par les lipases végétales se situe entre 0,25 et 0,45. Cependant, chaque lipase possède bien entendu une gamme d' a_w optimale, parfois très étroite, pour laquelle son activité est maximale.

Dans tous les cas (acidolyse, trans- et interestérification) la teneur en TAGs néoformés dans le milieu réactionnel rend compte de l'activité de transfert d'acyles du biocatalyseur pour les deux substrats initiaux. Par conséquent, l'activité de transfert d'acyles en interestérification (A_{inter}), en acidolyse (A_{acido}) et en transestérification (A_{trans}) sera toujours évaluée de manière identique ; c'est-à-dire calculée par régression polynomiale (du second degré) à partir des différentes courbes de cinétique, en portant en abscisses le temps de réaction (en heures) et en ordonnées, la teneur totale en TAGs néoformés dans le milieu réactionnel (en μ moles). Ces activités, que l'on dénommera par «activités acyltransférasiques» seront exprimées en unités de transacylation (UT) ; une UT correspondant à 1 μ mol de TAGs néoformés dans le milieu réactionnel par heure et par gramme de biocatalyseur.

Tous les lots de *C. papaya* et d'*A. comosus* ont été testés lors de ces trois types de réaction de transacylation. Dans nos conditions expérimentales (10% p/p de biocatalyseur en présence d'hexane), les réactions de transacylation menées avec les extraits bruts (tiges, feuilles et racines) d'*A. comosus* ainsi qu'avec la préparation commerciale de bromélaïne (Sigma) n'ont pas évoluées. Ces préparations n'ont donc exprimé aucune activité de transfert d'acyles avec des TAGs en interestérification, acidolyse et transestérification. Cependant il ne faut pas oublier que la préparation de bromélaïne possède un fort potentiel pour des réactions d'estérification (AGLs + alcool) comme l'on parfaitement démontré Mukherjee *et al.* (1998). Ce biocatalyseur peut donc tout de même être valorisé dans des réactions de transformation de corps gras et/ou de protéines (en raison de sa forte activité protéolytique). La préparation commerciale de bromélaïne ainsi que les extraits bruts d'ananas (après quelques étapes d'extraction/purification enzymatiques) pourraient par exemple être utilisés comme biocatalyseur afin de greffer divers acides aminés sur des AGLs (synthèse d'amides N-substituées) ou sur des sucres (synthèse d'esters d'acides aminés de sucre, type lysinate de fructose). Ces préparations pourraient aussi permettre de synthétiser sélectivement des composés ayant des propriétés physiques et chimiques préétablies, selon leurs sélectivités envers tel ou tel alcool et/ou tel ou tel AG en estérification enzymatique.

Il s'avère aussi que les préparations de papaine raffinée ou purifiée commercialisées par Merck, Reco Industries Ltd. et Valley Research Co. sont inactives lors de ces trois réactions de transacylation enzymatiques. Ces préparations purifiées n'ont engendré aucun transfert d'acyles entre les deux substrats lipidiques initiaux. Etant donné qu'il s'agit uniquement des composés enzymatiques solubles en phase aqueuse du latex de *C. papaya*, c'est à dire ne contenant *à priori* que des enzymes protéolytiques, nous pouvons affirmer que ces protéases ne possèdent aucune activité acyltransférase lors des réactions classiques de biofaçonnement des corps gras. Ces lots purifiés ne contiennent donc pas de lipases, ni d'acyltransférases. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Mukherjee *et al.* (1998) qui ont démontré que la chymopapaine et la papaine (deux protéases purifiées du latex de *C. papaya*) sont incapables de catalyser des réactions d'estérification de divers AGs avec du *l*-butanol ; seul le latex brut de *C. papaya* est capable de catalyser cette réaction de synthèse enzymatique.

Les valeurs d'activité d'interestérification des divers latex bruts de *C. papaya* étudiés sont répertoriées dans le tableau X (activités déterminées par régression polynomiale du second degré).

Tableau X : Activités d'interestérification des différents latex bruts de *C. papaya*

Préparations enzymatiques	a_w	Evolution des TAGs néoformés (%mol. par rapport aux TAGs totaux)						Activité* (UT/g)
		Temps(h.)	0	5	8	24	48	78
Papaine brute (Sigma) :	0.57	0,0	12,8	19,5	37,3	54,9	65,8	339
Latex brut – 1^{ère} incision								
■Variété "MTQ2" : (Guadeloupe)	0.43	0,0	7,3	11,0	24,8	44,0	57,0	201
■Variété "Deshaies": (Guadeloupe)	0.70	0,0	5,2	9,2	23,9	39,1	51,9	120
■Variété "Locale-parcelle38": (Madagascar)	0.45	0,0	1,7	2,5	7,4	16,3	25,0	50
Latex brut – 2^{ème} incision								
■Variété "Deshaies": (Guadeloupe)	0.56	0,0	5,5	8,9	22,4	36,4	49,4	120
■Variété "Locale-parcelle38": (Madagascar)	0.52	0,0	0,5	0,8	1,9	4,0	6,8	15

* Les activités d'interestérification sont exprimées en μ mol de TAGs néoformés dans le milieu réactionnel par heure et par gramme de biocatalyseur (interestérification entre TriC12:0 et TriC10:0 ; 1/1, mol/mol)

Les valeurs d'activité d'acidolyse et de transestérification des divers latex bruts de *C. papaya* étudiés sont répertoriées dans les tableaux XI et XII (activités déterminées par régression polynomiale du second degré).

Tableau XI : Activités d'acidolyse des différents latex bruts de *C. papaya*

Préparations enzymatiques	a _w	Evolution des TAGs néoformés						Activité* (UT/g)	
		(%mol. par rapport aux TAGs totaux)							
		Temps(h.)	0	5	8	24	48	78	
Papaïne brute (Sigma) :	0.57		0,0	25,3	37,2	69,1	82,6	87,3	517
Latex brut – 1 ^{ère} incision									
■Variété “MTQ2” :	0.43		0,0	9,6	14,1	39,2	53,6	73,2	220
(Guadeloupe)									
■Variété “Deshaies”:	0.70		0,0	10,6	15,7	38,3	62,9	74,6	238
(Guadeloupe)									
■Variété “Locale-parcelle38”:	0.45		0,0	1,4	2,2	6,4	11,5	17,0	29
(Madagascar)									
Latex brut – 2 ^{ème} incision									
■Variété “Deshaies”:	0.56		0,0	7,2	11,3	31,1	51,9	66,7	149
(Guadeloupe)									
■Variété “Locale-parcelle38”:	0.52		0,0	0,9	1,4	4,3	7,1	10,6	17
(Madagascar)									

* Les activités d'acidolyse sont exprimées en μ mol de TAGs néoformés dans le milieu réactionnel par heure et par gramme de biocatalyseur (acidolyse entre TriC12:0 et AGL C10:0, 1/3, mol/mol).

Tableau XII : Activités de transestérification des différents latex bruts de *C. papaya*

Préparations enzymatiques	a _w	Evolution des TAGs néoformés						Activité* (UT/g)	
		(%mol. par rapport aux TAGs totaux)							
		Temps(h.)	0	5	8	24	48	78	
Papaïne brute (Sigma):	0.57		0,0	3,1	5,5	16,2	32,3	46,4	37
Latex brut – 1^{ère} incision									
■Variété “MTQ2” :	0.43		0,0	1,0	1,4	3,5	6,4	8,7	18
(Guadeloupe)									
■Variété “Deshaies”:	0.70		0,0	0,9	1,3	2,7	4,9	7,2	14
(Guadeloupe)									
■Variété “Locale-parcelle38”:	0.45		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
(Madagascar)									
Latex brut – 2^{ème} incision									
■Variété “Deshaies”:	0.56		0,0	0,9	1,4	3,2	5,7	7,6	14
(Guadeloupe)									
■Variété “Locale-parcelle38”:	0.52		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
(Madagascar)									

* Les activités de transestérification sont exprimées en μ mol de TAGs néoformés dans le milieu réactionnel par heure et par gramme de biocatalyseur (transestérification entre TriC12:0 et EM C10:0 ; 1/3, mol/mol).

Respectant l'objectif de caractériser les activités lipasiques des divers latex bruts de *C. papaya* étudiés et de différencier les aptitudes technologiques de ces derniers en fonction de l'origine géographique et/ou de la variété, nous sommes parvenus à établir un classement de ces latex en fonction de leurs activités respectives. Ce classement figure dans le tableau XIII, exprimant les résultats en activité relative (%) par rapport au latex brut présentant la plus forte activité lipasique considérée (en hydrolyse, en interestérification, en acidolyse et en transestérification).

Tableau XIII : Activités enzymatiques relatives (%) en lipolyse, en interestérification, en acidolyse et en transestérification des divers latex bruts de C. papaya.

Préparations enzymatiques	<u>Lipolyse</u>	<u>Interestérification</u>	<u>Acidolyse</u>	<u>Transestérification</u>
	Activité %	Activité %	Activité %	Activité %
Papaïne brute (Sigma):	100 %	100 %	100 %	100 %
Latex brut – 1^{ère} incision				
■ <i>Variété "MTQ2"</i> : (Guadeloupe)	37 %	59 %	43 %	49 %
■ <i>Variété "Deshaies"</i> : (Guadeloupe)	52 %	35 %	46 %	38 %
■ <i>Variété "Locale-parcelle38"</i> : (Madagascar)	9 %	15 %	6 %	0 %
Latex brut – 2^{ème} incision				
■ <i>Variété "Deshaies"</i> : (Guadeloupe)	20 %	35 %	29 %	38 %
■ <i>Variété "Locale-parcelle38"</i> : (Madagascar)	4 %	4 %	3 %	0 %

Le latex brut commercialisé par Sigma présente l'activité lipasique optimale aussi bien en hydrolyse, qu'en interestérification, transestérification ou acidolyse (alors que ce latex présentait la plus faible activité protéolytique). Les résultats semblent indiquer que les activités protéolytiques et lipasiques sont indépendantes l'une de l'autre. En aucun cas l'activité protéolytique ne peut être une indication précise de l'activité lipolytique du latex. Ces deux activités diffèrent significativement selon la localisation géographique des cultures, la variété et la fréquence des saignées. Le classement des lots indique que seules les premières incisions de latex provenant des deux variétés de Guadeloupe (*MTQ2* et *Deshaies*) renferment des activités lipasiques potentiellement intéressantes pour des applications au biofaçonnement des corps gras ; la variété «*MTQ2*» possède tout de même une qualité lipasique (en terme d'activité) supérieure à la variété «*Deshaies*» (sauf en lipolyse). En interestérification par

exemple, l'activité relative du latex de la variété «*MTQ2*» représente 59% de l'activité du latex brut commercialisé par Sigma, alors que l'activité du latex de la variété «*Deshaies*» ne représente que 35% de cette même activité. Les latex provenant de la variété locale de Madagascar renferment tous de très faibles activités lipasiques, aussi bien en hydrolyse qu'en transacylation, alors que ces derniers renfermaient des activités protéolytiques assez élevées. Selon la réaction de synthèse lipidique étudiée, l'activité lipasique relative du latex provenant de la première saignée de cette variété de Madagascar varie de 0 à 15% (pourcentage par rapport à l'activité du latex brut commercialisé par Sigma).

La fréquence des saignées influence considérablement les activités lipasiques de tous les latex bruts de papaye. En effet, les résultats indiquent que dans l'ensemble, les latex obtenus lors de la première saignée renferment des activités lipasiques nettement supérieures à celles des latex recueillis lors de la seconde saignée réalisée à cinq jours d'intervalle. Ce qui n'était pas le cas pour les activités protéolytiques de ces mêmes latex car indépendamment de la variété étudiée, les deux incisions de latex présentent quasiment la même activité protéolytique.

Quant à la corrélation entre l'évolution des activités des lipases en hydrolyse et en transacylation, celle-ci n'est pas toujours strictement définie ; c'est à dire qu'une préparation lipasique peut présenter une forte activité lipolytique et indifféremment, une faible ou forte activité lipasique en transacylation. Le latex de la variété «*MTQ2*» de Guadeloupe présente par exemple une activité lipasique en hydrolyse inférieure au latex de la variété «*Deshaies*» de Guadeloupe (37% pour 52%), alors que lors des réactions d'interestérification c'est le contraire (59% pour 35%). De plus, pour les latex obtenus lors de la première et de la seconde saignée des papayes, les pertes d'activités en hydrolyse et en transacylation ne sont jamais équivalentes ; par exemple entre les deux saignées de la variété «*Deshaies*» de Guadeloupe, la perte d'activité est de 50% en hydrolyse, 20% en acidolyse et nulle en trans- ou interestérification. Toutes ces remarques sont en parfaite adéquation avec les résultats trouvés antérieurement par Muderhwa *et al* (1988), à savoir que la corrélation entre les activités lipasiques en hydrolyse et en transacylation n'est jamais strictement définie.

En conclusion, les premières incisions de latex provenant des deux variétés de papaye de Guadeloupe possèdent un fort potentiel comme biocatalyseur des réactions de transformation de corps gras. Ils peuvent être employés pour modifier la composition en AG

et la distribution des TAGs dans diverses huiles et graisses. Cette nouvelle méthode de détermination de l'activité de transfert d'acyles en synthèse enzymatique paraît donc très efficace pour comparer les qualités lipasiques (en terme d'activité) de divers extraits bruts végétaux susceptibles de contenir des acyltransférases. Il a aussi été mis en évidence, qu'il est indispensable d'évaluer ces activités enzymatiques indépendamment lors de chaque type de réaction car pour un même biocatalyseur, ces activités ne sont pas les mêmes selon la réaction enzymatique étudiée (lipolyse, acidolyse, trans- ou interestérification).

D - 3 / Etude de la typosélectivité des lipases en interestérification.

La sélectivité d'une lipase en hydrolyse peut ne pas être conservée dans des réactions d'interestérification. Par conséquent, si la même lipase est utilisée en interestérification, en milieu non aqueux par exemple, son activité et sa sélectivité devront être évaluées indépendamment. C'est pour cette raison qu'après avoir déterminé la typosélectivité des lipases de *C. papaya* et d'*A. comosus* en hydrolyse, nous allons maintenant évaluer leur typosélectivité en interestérification enzymatique.

Divers TAGs homogènes (saturés, mono- ou polyinsaturés) sont interestérifiés séparément avec la tributyrine (TriC4:0), dans un rapport équimoléculaire. Les réactions sont menées avec 10% (p/p) de biocatalyseur par rapport aux composés lipidiques totaux, à 50°C et en présence d'hexane. Les lipases vont catalyser des transferts d'acyles entre les deux TAGs initiaux. Chaque transfert d'acyle entre la tributyrine (BuBuBu) et le second TAG homogène (que l'on dénommera XXX) sera caractérisé par la formation de nouveaux TAGs ayant un ou deux résidus "butyryl" : BuXX ou BuBuX.

Dans nos conditions expérimentales, les réactions d'interestérification menées avec la préparation commerciale de bromélaïne de Sigma ($a_w=0,29$; teneur en eau=2,9% et teneur en protéines=38,2%) indiquent que les enzymes d'*A. comosus* n'expriment aucune activité de transfert d'acyles (et *à fortiori* aucune typosélectivité) en interestérification pour tous les TAGs homogènes testés séparément avec la tributyrine en présence de *n*-hexane. En ce qui concerne les réactions d'interestérification, entre la TriC4:0 et les autres TAGs homogènes, biocatalysées par la préparation commerciale de papaine 'crude powder' de Sigma ($a_w=0,57$; teneur en eau=7,8% et teneur en protéines=60,7%), les données indiquent que l'activité de transfert d'acyles est maximale en interestérifiant la TriC4:0 avec des TAGs à chaînes courtes. Par exemple avec la tricaproïne (TriC6:0), la teneur en TAGs néoformés dans la

fraction triglycéridique totale est de 70,4 %mol. (moles % par rapport aux TAGs totaux) après 24 h. de réaction (figure 9).

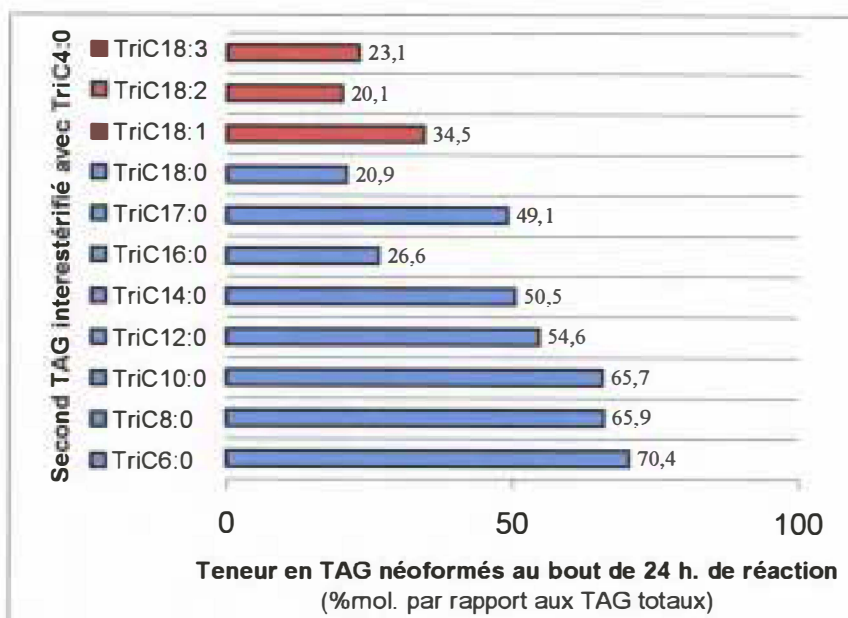


Figure 9 : TAG néoformés au bout de 24 h. lors des réactions d'interestérification biocatalysées par les lipases de *C. papaya*, entre la tributyrine et une série de TAGs homogènes.

Pour les réactions d'interestérification entre la TriC4:0 et les autres TAGs homogènes saturés (Tri C8:0 à Tri C18:0), le taux de TAGs néoformés diminue avec la longueur de chaîne des seconds TAGs (seulement 20,9%mol. de TAGs néoformés avec la TriC4:0 + TriC18:0), excepté pour l'interestérification entre la TriC4:0 et la trimargarine (TriC17:0) : 49%mol. de nouveaux TAGs. Pour les réactions d'interestérification entre la TriC4:0 et les TAGs homogènes insaturés, les différences suivantes sont observées : la trioléine qui est un TAG monoinsaturé, réagit plus rapidement avec la tributyrine (34%mol. de TAGs néoformés) que les TAGs polyinsaturés comme la trilinoléine (double insaturation) ou la tri α -linoléine (triple insaturation). Pour ces derniers substrats, les rendements en TAGs néoformés sont seulement de 20,1%mol. et 23,1%mol., respectivement, après 24 h. d'interestérification.

Désirant approfondir l'étude du comportement de ces lipases du latex de *C. papaya* en interestérification enzymatique, nous avons aussi analysé la proportion relative des TAGs néoformés ayant un ou deux résidus "butyryl" (BuXX ou BuBuX) en fonction du temps de réaction (tableau XIV), lors des réactions d'interestérification entre la TriC4:0 et les autres TAGs homogènes.

Tableau XIV : Formation des nouveaux TAGs ayant un ou deux résidus "butyryl" lors de l'interestérification entre la tributyrine et une série de TAGs homogènes.

Fraction triglycéridique (% molaire par rapport aux TAGs totaux)	Temps d'interestérification (en heures)			
	0	1	6	24
• Tributyrine (BuBuBu) + Tricaproïne (CaCaCa)				
TAGs résiduels	100,0	81,6	50,5	29,6
BuBuCa néoformés	-	10,1	27,0	36,1
BuCaCa néoformés	-	8,3	22,5	34,3
• Tributyrine (BuBuBu) + Tricapryline (CyCyCy)				
TAGs résiduels	100,0	87,8	59,1	34,1
BuBuCy néoformés	-	8,2	25,2	36,1
BuCyCy néoformés	-	4,0	15,7	29,8
• Tributyrine (BuBuBu) + Tricaprine (CCC)				
TAGs résiduels	100,0	85,0	59,8	34,3
BuBuC néoformés	-	9,9	23,6	32,6
BuCC néoformés	-	5,1	16,6	33,1
• Tributyrine (BuBuBu) + Trilaurine (LaLaLa)				
TAGs résiduels	100,0	92,5	73,4	45,4
BuBuLa néoformés	-	5,4	18,1	32,5
BuLaLa néoformés	-	2,1	8,5	22,2
• Tributyrine (BuBuBu) + Trimyristine (MMM)				
TAGs résiduels	100,0	92,2	72,6	49,5
BuBuM néoformés	-	5,9	19,8	32,3
BuMM néoformés	-	1,9	7,6	18,2
• Tributyrine (BuBuBu) + Tripalmitine (PPP)				
TAGs résiduels	100,0	97,8	89,0	73,4
BuBuP néoformés	-	1,7	8,3	19,1
BuPP néoformés	-	0,4	2,7	7,5
• Tributyrine (BuBuBu) + Trimargarine (MaMaMa)				
TAGs résiduels	100,0	94,7	78,9	50,9
BuBuMa néoformés	-	3,7	15,8	32,2
BuMaMa néoformés	-	1,6	5,3	16,9
• Tributyrine (BuBuBu) + Tristearine (SSS)				
TAGs résiduels	100,0	98,3	91,5	79,1
BuBuS néoformés	-	1,3	6,3	15,1
BuSS néoformés	-	0,4	2,1	5,8
• Tributyrine (BuBuBu) + Trioléine (OOO)				
TAGs résiduels	100,0	96,5	85,3	65,5
BuBuO néoformés	-	2,5	11,4	24,4
BuOO néoformés	-	1,0	3,3	10,1
• Tributyrine (BuBuBu) + Trilinoléine (LLL)				
TAGs résiduels	100,0	96,2	86,4	79,9
BuBuL néoformés	-	2,9	10,6	15,6
BuLL néoformés	-	0,8	3,0	4,5
• Tributyrine (BuBuBu) + Tri α -linolenine (LnLnLn)				
TAGs résiduels	100,0	93,4	83,9	76,9
BuBuLn néoformés	-	5,1	12,4	17,7
BuLnLn néoformés	-	1,5	3,6	5,4

Les résultats montrent que durant toutes ces réactions d'interestérification, le pourcentage de TAGs néoformés ayant deux résidus "butyryl" (BuBuX) est toujours supérieur à celui des nouveaux TAGs n'ayant qu'un résidu "butyryl" (BuXX). Ce phénomène est d'autant plus prononcé pour les réactions d'interestérification entre la tributyrine et les TAGs homogènes à chaînes longues. En effet, pendant les 6 premières heures de réaction, le rapport "BuBuX / BuXX" est de 1,2-1,6 pour les réactions avec la tricaproïne, la tricapryline ou la tricaprène comme donneur d'acyles et il est de 2,1-2,6 pour les réactions avec la trilaurine ou la trimyristine. Pour les réactions entre la tributyrine et les autres TAGs saturés à chaînes longues (tripalmitine, trimargarine et tristéarine) ce rapport est de 3,0-3,1. Celui-ci est égal à 3,5 pour les réactions entre la tributyrine et les TAGs insaturés à chaînes longues (trioléine, trilinoléine et tri α -linoléine). A côté de ces TAGs néoformés, il y a aussi formation de glycérides partiels dans le milieu réactionnel (selon la teneur en eau et l' a_w initiale du biocatalyseur). Cependant pour toutes ces réactions d'interestérification, la teneur en glycérides partiels dans le milieu réactionnel reste inférieure à 11% (p/p) par rapport aux composés lipidiques totaux, au bout de 78 heures de réaction. Ces résultats laissent donc supposer que lors des réactions d'interestérification entre un TAG homogène court et un TAG homogène long, la teneur en TAGs néoformés ayant deux résidus «AGs courts» sera toujours supérieure à celle des nouveaux TAGs ayant deux résidus «AGs longs». La différence entre ces deux teneurs sera d'autant plus marquée que l'écart entre les longueurs de chaînes carbonées des deux TAGs initiaux sera important. Ces résultats sont complémentaires avec ceux obtenus par Villeneuve *et al* (1997), dans lesquels la sélectivité des lipases de *C. papaya* a été déterminée dans des réactions d'interestérification entre la tricapryline et une autre série de TAGs homogènes.

L'étude des activités acyltransférasiques ainsi que la détermination des sélectivités particulières de ces préparations lipasiques végétales lors des réactions classiques de biofaçonnement des corps gras, sont potentiellement très intéressantes en ce qui concerne la valorisation industrielle de ces extraits végétaux. En effet, les préparations lipasiques brutes exprimant une forte activité de transfert d'acyles ainsi qu'une sélectivité adéquate en transacylation sont considérées comme de très bons biocatalyseurs pour des réactions de biofaçonnement des corps gras. Ces préparations lipasiques d'origine végétale présentent entre autres beaucoup plus d'avantages que des catalyseurs chimiques classiques et sont beaucoup moins onéreux. De par les fortes activités acyltransférasiques des lipases du latex de *C. papaya* ainsi que de leurs sélectivités particulières, ces dernières peuvent être employées en

acidolyse et/ou en inter- ou transestérification, afin d'éliminer sélectivement des AGs courts dans une huile et de les remplacer, notamment par des AGs insaturés à chaînes longues (AGs essentiels,...). Ces biocatalyseurs végétaux peuvent être utilisés pour modifier non seulement la composition en AG mais aussi la distribution des TAGs dans diverses huiles, afin d'obtenir de nouveaux produits ayant des propriétés physiques et chimiques préétablies. Ils pourraient être aussi employés lors de réaction d'interestérification afin d'accroître la proportion en TCM dans les huiles lauriques.

PARTIE II : SYNTHÈSE DE TRIGLYCÉRIDES À CHAINES MOYENNES (TCM)

Les TCM représentent des produits pharmaceutiques à forte valeur ajoutée de par leurs utilisations en néonatalogie (incorporation dans des laits maternisés et des préparations hospitalières pour prématurés), en gériatrie (dans des préparations gérologiques diverses), en cosmétologie et en nutrition sportive (boissons énergétiques,...). L'intérêt biologique de ces composés réside dans le fait que les AGs saturés à chaîne moyenne, issus de l'hydrolyse de ces TCM dans le tractus intestinal, traversent facilement la paroi intestinale et ne sont que très peu réestérifiés dans le sang. Ces AGs ne nécessitent pas de complexation avec la carnitine pour pénétrer dans les mitochondries et sont rapidement oxydés. Par conséquent, ils permettent d'apporter beaucoup plus d'énergie à l'organisme en un temps relativement court. Ces TCM sont susceptibles d'apporter des solutions à bien des pathologies nutritionnelles car aucun corps gras naturel n'en contient une teneur assez élevée pour satisfaire les besoins énergétiques des prématurés, des personnes âgées ou des sportifs.

Industriellement, ces TCM sont fabriqués majoritairement, voire exclusivement par voie chimique. Deux types de TCM, constitués des TAGs des acides caprylique et caprique, en C8 et C10, sont principalement commercialisés. Le plus courant comprenant 60% d'acide caprylique et le deuxième environ 70% du même acide gras. Les huiles végétales de départ employées sont l'huile de coprah et de palmiste, car celles-ci contiennent des AGs en C8 et C10 en proportion notable par rapport à leurs AGs totaux, respectivement 15 et 7,5% en moyenne. Les coûts de production de cette synthèse chimique sont cependant très élevés car la méthodologie à employer nécessite des substrats complètement anhydres, des conditions assez rudes de température et de pression ainsi que plusieurs étapes de retraitement des produits de la réaction :

- *Hydrolyse sous une pression de 70 bars et à 250°C de l'huile de coprah.*
- *Distillation des AGs obtenus.*
- *Séparation des AGs saturés à chaîne moyenne (C8:0 et C10:0)*
- *Réestérification chimique de ces AGs avec du glycérol.*
- *Purification des TAGs obtenus → Isolement des TCM.*

Lors d'une interestérification enzymatique, l'utilisation des biocatalyseurs permet de travailler dans des meilleures conditions réactionnelles que lors des synthèses chimiques. Les avantages de cette réaction biocatalysée sont multiples et elle permet de plus, en fonction du biocatalyseur employé et du type de corps gras à biofaçonner, d'aboutir à des produits finaux plus spécifiques, c'est-à-dire plus proches des produits réactionnels désirés. Divers biocatalyseurs peuvent être employés, mais les enzymes végétales sont généralement plus disponibles et moins coûteuses que les enzymes du règne animal ou microbien. Ce qui est le cas des latex bruts de papaye (très disponibles et peu coûteux du fait qu'il n'y a pas d'étapes d'extraction ou de purification enzymatique). Ces latex expriment de plus diverses activités enzymatiques et notamment des activités lipolytiques et acyltransférasiques en interestérification assez importantes. D'où l'intérêt de pouvoir les employer comme biocatalyseurs lors de l'interestérification enzymatique sélective de l'huile de coprah afin de synthétiser des TCM entre autres. Les résultats précédents portant entre autres sur la caractérisation des activités enzymatiques des divers latex bruts de *C. papaya*, nous ont permis de sélectionner les variétés appropriées aux usages finaux désirés (protéolyse, lipolyse et/ou biofaçonnement des corps gras). Ainsi nous pouvons effectuer une première sélection quant aux latex qui seront utilisés pour les réactions de biofaçonnement des corps gras. En effet, nous conserverons pour ces réactions de transacylation enzymatiques, le latex brut de *C. papaya* commercialisé par Sigma ainsi que les premières incisions de latex bruts de *C. papaya* var. "MTQ2" et "Deshaies" de Guadeloupe. Seuls ces latex bruts expriment une bonne activité de transfert d'acyles en interestérification et pourront éventuellement réaliser le biofaçonnement de l'huile de coprah.

A. MISE EN OEUVRE DES CONDITIONS OPERATOIRES OPTIMALES

Préalablement à la mise en œuvre des lipases du latex de *C. papaya* dans ce type de synthèse enzymatique, il faut avant tout déterminer les conditions optimales de ces réactions d'interestérification (c'est-à-dire maîtriser tous les paramètres régissant le micro-

environnement de l'enzyme), ainsi qu'évaluer les meilleurs donneurs d'acyles à employer avec ces lipases de *C. papaya* en interestérification.

A - 1 / Choix des substrats lipidiques adéquats.

L'évolution des réactions d'interestérification biocatalysées par les lipases végétales est fonction des TAGs utilisés et de la nature des groupements donneurs d'acyles employés. Afin de déterminer le donneur d'acyles adéquat à interestérifier avec les TAGs de coprah pour obtenir l'optimum de biofaçonnement de cette huile par les lipases du latex de *C. papaya*, nous avons suivi le biofaçonnement de la trilaurine (TAG majoritaire de l'huile de coprah) par ces mêmes lipases en employant successivement différents donneurs d'acyles : des TAGs, des AGLs, puis des esters d'AGs. Ces réactions enzymatiques sont les suivantes :

- De type "interestérification" (avec des TAGs) : trilaurine + tricapriline (Tri C10:0)
- De type "acidolyse" (avec des AGLs) : trilaurine + acide caprique (AGL C10:0)
- De type "transestérification" (avec des esters d'AGs) : trilaurine + esters d'ac. caprique [ester méthylique (Me), ester éthylique(Et), ester propylique(Pr) et ester butylique(Bu)].

Toutes les réactions sont menées avec 10% (p/p) de biocatalyseur par rapport aux composés lipidiques totaux et à 50°C en présence de *n*-hexane. Le biocatalyseur employé est le latex brut de *C. papaya* 'crude powder' commercialisé par Sigma-Aldrich Ltd. ($a_w=0,57$; teneur en eau=7,8% et teneur en protéines=60,7% protéines). L'évolution de la teneur en TAGs néoformés ainsi l'incorporation de l'acide laurique (C12:0) lors de chaque type de réactions enzymatiques sont représentées dans les figures 10 et 11.

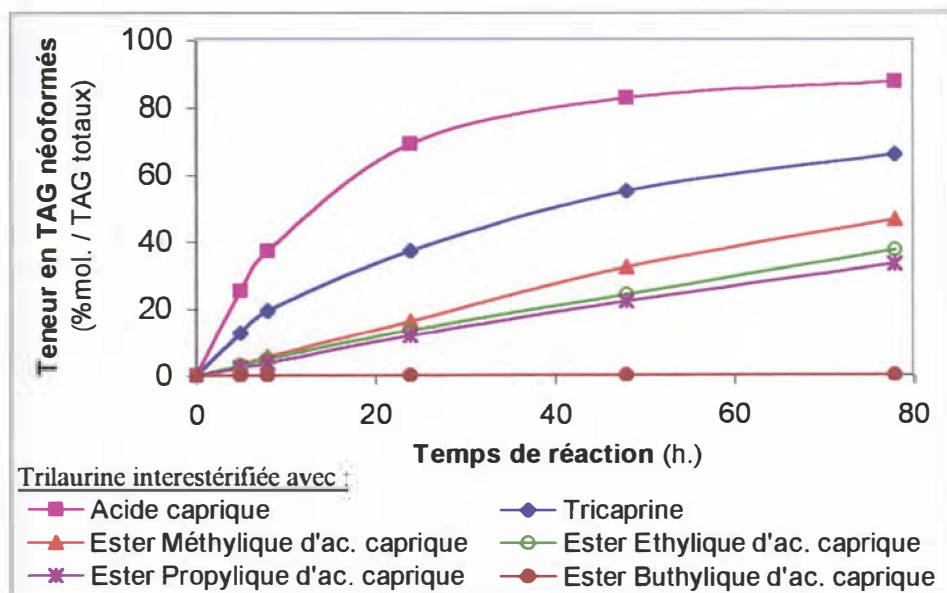


Figure 10 : Evolution de la teneur en TAGs néoformés lors des réactions biocatalysées par le latex brut de *C. papaya* de Sigma, entre la trilaurine et divers groupements donneurs d'acyles.

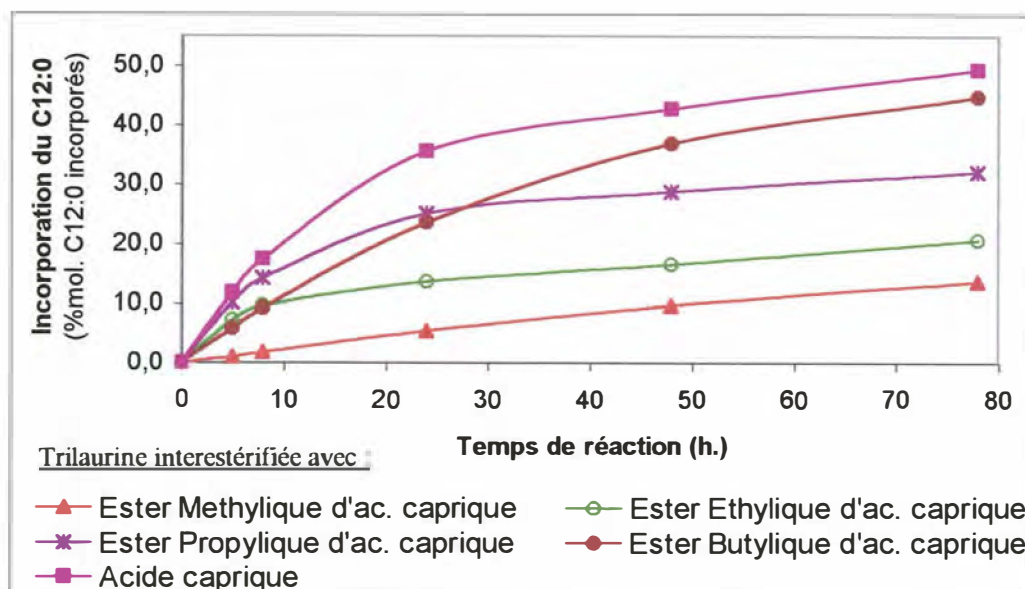


Figure 11 : Evolution de l'incorporation du C12:0 lors des réactions biocatalysées par le latex brut de *C. papaya* de Sigma, entre la trilaurine et divers groupements acyles donneur.

Pour obtenir la teneur optimale en TAGs néoformés dans le milieu réactionnel lors des réactions de transacylation biocatalysées par les lipases du latex de *C. papaya*, le meilleur donneur d'acyles à mettre en œuvre avec les TAGs de coprah serait des AGLs (AGL de coprah, AGL en C8 ou C10, etc.). En effet avec ce type de substrat, on obtient l'optimum de la teneur en TAGs néoformés et l'optimum d'incorporation de l'acide laurique. Ces résultats regroupent ceux trouvés par Villeneuve *et al.* (1997) qui ont étudié la réaction de transestérification de la tricapryline catalysée par le latex brut de *C. papaya*, avec comme groupements donneurs d'acyles : des AGLs et des esters méthyliques et vinyliques d'acide laurique. Ces auteurs ont aussi remarqué que la meilleure incorporation de résidus lauriques à l'intérieur de la fraction triglycéridique de départ est obtenue avec des AGLs ou des esters vinyliques d'AGs.

A - 2 / Influence de la température et de l' a_w en interestérification enzymatique.

Les paramètres expérimentaux qui ont été pris en compte pour la détermination des conditions opératoires optimales favorisant les réactions d'interestérification biocatalysées par les lipases du latex de *C. papaya* sont la température du système et l' a_w du biocatalyseur. Pour ces lipases du latex de *C. papaya*, l'activité lipolytique optimale (hydrolyse des TAGs) est obtenue avec une température de 50°C pour un temps d'incubation de 10 minutes ; la température optimale de ces lipases en interestérification (pour un temps d'incubation d'environ 24 à 48 h.) peut être différente. L' a_w du biocatalyseur influence aussi

considérablement les cinétiques de ces réactions de synthèse enzymatiques (principal paramètre qui régit la réversibilité entre les réactions de synthèse et d'hydrolyse enzymatique). Ces déterminations de température et d' a_w optimales en interestérification sont réalisées en employant comme biocatalyseur, le latex brut de *C. papaya* 'crude powder' commercialisé par Sigma qui comme nous l'avons vu antérieurement, exprime la meilleure activité de transfert d'acyles en interestérification. Les réactions utilisent comme substrat, de la tricaprine (100 μ mol) et de la triaurine (100 μ mol). Ces réactions sont menées avec 10% (p/p) de latex brut par rapport aux composés lipidiques totaux et en présence de *n*-hexane. L'évolution de la teneur en TAGs néoformés ainsi que le taux de formation des glycérides partiels au cours du temps sont déterminés par CPG.

■ Influence de la température :

Les différentes températures d'interestérification testées varient de 30 à 66°C (pour un temps d'incubation allant jusqu'à 24h. de réaction). Les résultats du suivi analytique des réactions d'interestérification sont représentés à la figure 12.

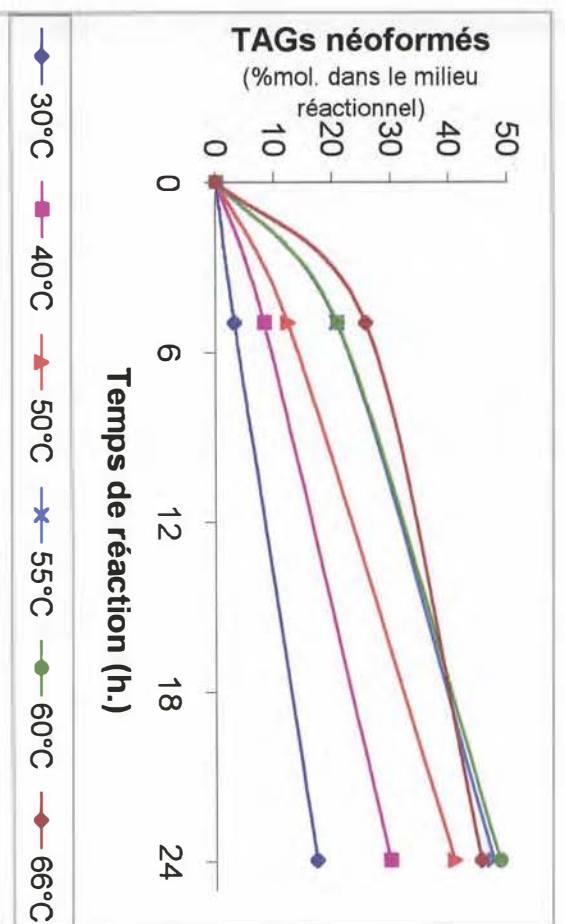


Figure 12 : Evolution de la teneur en TAGs néoformés en fonction de la température d'interestérification.

La température optimale (pour un temps d'incubation de 24h.) des réactions d'interestérification biocatalysées par les lipases du latex de *C. papaya* est de 55-60°C. Nous notons une certaine diminution de l'activité acyltransférase de l'enzyme qu'à partir de 5 heures pour une température de 68°C. Ces résultats montrent la forte thermorésistance de ces lipases de *C. papaya*, ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle ces lipases sont fixées sur des

polysaccharides comme l'ont suggéré Giordani *et al.* (1991). En effet, les enzymes fixées sont généralement plus thermostables. En conclusion, dans nos essais de synthèse de TCM par interesterification enzymatique (temps d'incubation allant de 24 à 78h. de réaction), les réactions biocatalysées par ces lipases végétales seront menées à 60°C, afin de réaliser le maximum de biofaçonnement sans toutefois dénaturer l'enzyme.

■ Influence de l' a_w du biocatalyseur :

La préparation lipasique employée (latex brut de *C. papaya* commercialisé par Sigma) possède une a_w initiale de 0,57. Cette préparation est déshydratée progressivement dans un dessiccateur hermétiquement fermé (*agent deshydratant* : cristaux de silice) pendant plusieurs heures afin d'obtenir une gamme d' a_w adéquate (allant de 0,27 à 0,57) pour ce latex brut de *C. papaya*. Les résultats du suivi analytique des réactions d'interesterification menées en présence de *n*-hexane et à 60°C (température optimale pour un temps d'incubation de 24h.) sont représentés à la figure 13.

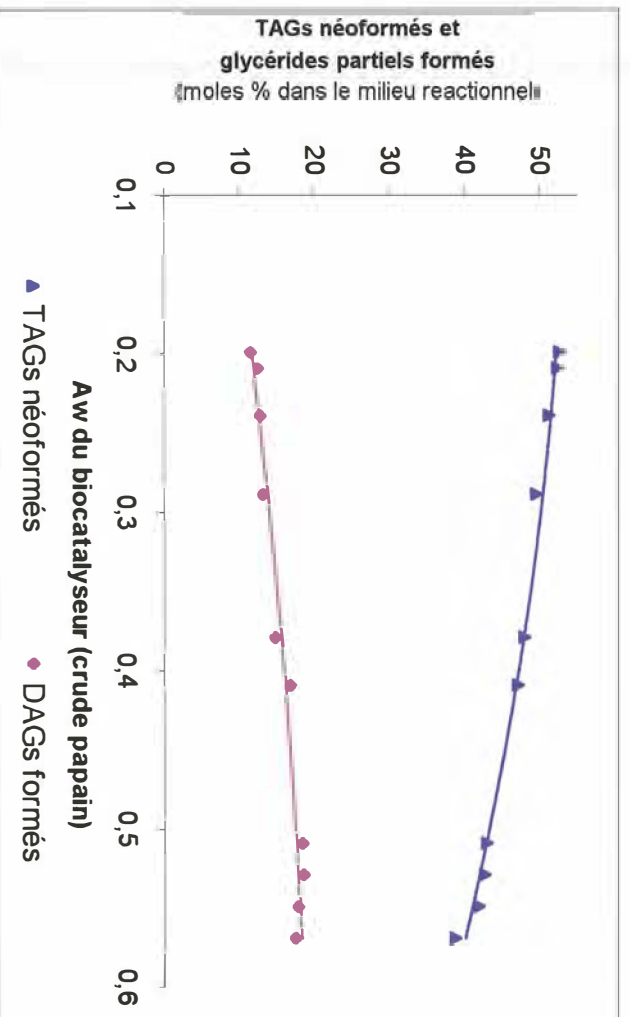


Figure 13 : Evolution de la teneur en TAGs néoformés et en glycérides partiels formés en fonction de l' a_w du latex brut de *C. papaya* (Sigma)

Pour ces réactions d'interesterification biocatalysées par les lipases du latex de *C. papaya*, l' a_w optimale est de 0,20 (sur la gamme d' a_w étudiée). En interesterification, il faut toujours se placer à la valeur optimale d' a_w du biocatalyseur. Si cette valeur est trop faible, l'enzyme n'a pas sa structure tridimensionnelle optimale et si elle est trop forte, le mélange réactionnel est proche d'un milieu aqueux donc compétition entre la réaction de synthèse

enzymatique et celle inverse d'hydrolyse. Les résultats indiquent que plus l'on se rapproche d'une $a_w=1,0$ et plus la teneur en glycérides partiels (DAGs,...) augmente progressivement avec parallèlement une diminution de la teneur en TAGs néoformés. Pour corréler l' a_w du biocatalyseur et la teneur en eau de celui-ci avec le taux de formation des nouveaux TAGs lors de ces réactions d'interestérification, des mesures de courbes de sorption sont actuellement en cours de réalisation. Cela permettra de mieux cerner les caractéristiques du biocatalyseur et de parfaire son utilisation dans ces réactions de synthèse enzymatiques.

Une détermination de l' a_w optimale en transestérification (sur le système de référence TAG coprah + stéarate de méthyle ; 20/1, mol/mol) des lipases du latex de *C. papaya* a déjà été réalisée par Ozenne [Ozenne, 1993]. Le taux de conversion optimal a été atteint avec l' a_w initiale du biocatalyseur étudié (latex brut de *C. papaya* de Sigma), à savoir $a_w=0,26$. La réhydratation du biocatalyseur a engendré une diminution de l'activité spécifique de transestérification de celui-ci.

B. CARACTERISATION DE L'HUILE DE COPRAH (NON INTERESTERIFIEE)

En lipochimie, le choix des corps gras de base pour une application donnée s'effectue essentiellement en fonction de leur composition en AG. Padley *et al.* (1986) ont établi une classification basée sur cinq types d'huiles (huiles lauriques, palmito-stéariques, oléiques, linoléiques et tri-insaturées ou siccatives). Le niveau d'insaturation et la distribution des diverses longueurs de chaînes des AGs constitutifs du corps gras étudié, rendent compte des propriétés rhéologiques de ce dernier (viscosité, point de congélation, point éclair, pouvoir détergent et bien d'autres). L'industrie de la lipochimie a pour objectif de transformer ces substances lipidiques en des dérivés présentant d'intéressantes propriétés nutritionnelles, diététiques, cosmétologiques, pharmacologiques ou autres : tensioactifs, lubrifiants, carburants, etc. L'huile de coprah appartient au type laurique car elle contient une forte teneur en acide laurique (C12:0) ainsi qu'en acide myristique (C14:0). Cette huile extraite par pression et extraction à l'hexane de l'albumen de noix de coco (*Cocos nucifera*) séché, est pour l'instant la principale source végétale d'AGs courts et moyens (entre 6 et 14 atomes de carbone). Elle se distingue tout particulièrement des autres corps gras en ce qui concerne les utilisations lipochimiques. Les tableaux XV et XVI indiquent la répartition des TAGs de l'huile de coprah (préalablement purifiée sur colonne d'alumine) selon leur nombre d'atomes de carbone (NC) ainsi que la composition en AG totaux dans cette fraction triglycéridique,

étudiée après dérivation des AGs en diéthylalkylcarbinols (DEAC) par les réactifs de Grignard à froid et en milieu étheré selon Pina *et al.* (1991).

Tableau XV : Composition en TAGs totaux (%mol. par rapport aux TAGs totaux):

TAG (NC)	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48
% mol.	0.7	3.4	14.0	18.3	20.2	17.7	10.6	7.4	4.0	2.1	1.7

Tableau XVI : Composition en AGs totaux (%mol. par rapport aux AGs totaux) :

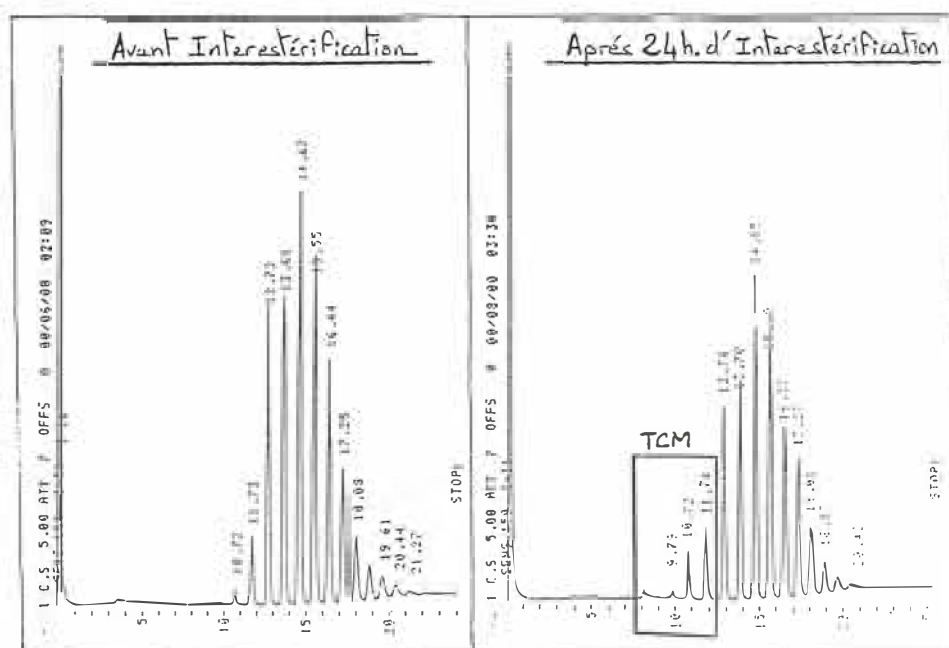
AG	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1 (n-9)	C18:2 (n-6)
% mol. dans les TAGs	1,2	10,7	7,9	49,7	16,9	7,5	2,3	4,6	1,3

La composition glycéridique de cette huile est très particulière. En effet, plus de 90% des AGs présents sont saturés et le C12:0 représente à lui seul environ la moitié des AGs totaux. Les AGs courts (6 à 10 atomes de carbone), les AGs moyens (12 à 14) et les AGs longs (16 à 18) représentent respectivement 20%, 67% et 13% des AGs totaux. Le C12:0 est plus abondant en position interne qu'en position externe. Les AGs courts et les autres AGs saturés sont préférentiellement distribués en position externe. L'acide oléique (C18:1, *n*-9) atteint plus de 70% en position externe alors que l'acide linoléique (C18:2, *n*-6) est légèrement plus abondant en position interne. Toutes ces caractéristiques font de cette huile, un corps gras particulièrement adapté pour des utilisations en biscuiterie-crèmerie-pâtisserie, margarines, shortenings (graisses émulsifiables,...) et en cosmétologie, pharmacologie, diététique, ...

C. BIOFAÇONNEMENT DE L'HUILE DE COPRAH PAR INTERESTÉRIFICATION ENZYMATIQUE

Un des objectifs de cette interestérification enzymatique est d'accroître la teneur en TCM (glycérol essentiellement estérifié par des AGs en C8 et C10) dans l'huile de coprah en une seule étape réactionnelle. En effet, les TCM actuellement commercialisés contiennent plus de 85% d'AG en C8 et C10 par rapport aux AGs totaux. La stratégie employée consiste à interestérifier les TAGs de coprah avec des donneurs d'acyles contenant des AGs courts. La spécificité des lipases en interestérification fera que les transferts d'acyles sur la position *sn*-3 des TAGs seront fortement avantageés par rapport aux transferts sur les deux autres positions. Les TAGs de coprah ont été interestérifiés séparément avec des AGL de coprah, des esters méthyliques, éthyliques et butyliques d'AG de coprah ainsi qu'avec des AGL de la matière grasse laitière. Divers rapports molaires « TAGs coprah / donneur d'acyles » (de 1/1 à 1/20,

mol/mol) ont été réalisés pour chaque essai de synthèse. Ces réactions enzymatiques ont aussi été étudiées d'une part en présence d'hexane (10 ml) et d'autre part en milieu lipidique fondu (c'est à dire sans solvant, avec des quantités plus importantes de substrat et en présence d'une phase aqueuse essentiellement apportée par le biocatalyseur). Tous les essais de synthèse ont été réalisés à 60°C (température optimale d'interestérification des lipases de *C. papaya* pour 24h. d'incubation). La préparation enzymatique employée est le latex brut de *C. papaya* commercialisé par Sigma et préalablement stabilisé dans sa configuration optimale ($a_w = 0,20$). Diverses proportions pondérales en biocatalyseur (de 1 à 20 % par rapport aux composés lipidiques totaux) ont aussi été étudiées. Des prélèvements du milieu réactionnel sont réalisés au cours du temps et jusqu'à l'équilibre total de la réaction. Les premières manipulations ont permis de mettre en évidence des regroupements de pics entre les TCM et les DAGs (à longues chaînes) néoformés par hydrolyse, lorsque les prélèvements sont directement analysés par CPG. Ces deux classes de composés lipidiques ont les mêmes temps de rétention dans nos conditions analytiques ; car en CPG les lipides sont identifiés selon leur nombre total de carbone (NC), donc selon leur poids moléculaires. Il était donc impossible de distinguer avec certitude l'augmentation de la teneur en TCM avec celle des DAGs. Pour lever l'ambiguïté, une séparation préalable des TAGs et des glycérides partiels est primordiale. Après avoir mis au point cette étape de séparation par chromatographie sur couche mince (CCM) de silice, les modifications de la distribution des TAGs de coprah ont été suivies par CPG sur phase apolaire (figure 14).



Une représentation graphique de la distribution des TAGs de coprah, avant et après 78h. heures d'interestérification à 60°C avec divers donneurs d'acyles et en présence de 10% de latex brut de *C. papaya* (Sigma) est indiquée à la figure 15.

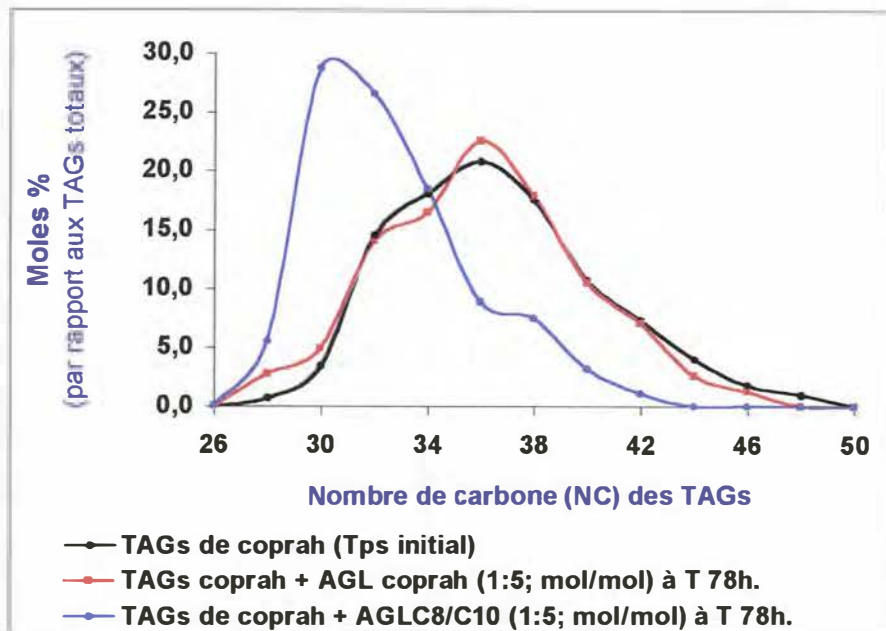


Figure 15 : Distribution des TAGs de coprah avant et après 78h. d'interestérification avec 10% de latex brut de *C. papaya* (Sigma).

Les résultats indiquent que la réaction d'interestérification des TAGs de coprah avec les AGL de coprah ne modifie que très faiblement la distribution des TAGs dans le milieu réactionnel. La teneur en TCM n'a guère augmentée par rapport à la réaction d'interestérification des TAGs de coprah avec un mélange équimoléculaire de C8 et C10. Tous les autres essais d'interestérification enzymatique aboutissent indubitablement à la même conclusion, à savoir une augmentation trop faible en TCM dans les temps qui nous ont été répartis (78h. maximum pour des applications industriels). L'obtention de ces TCM étant vraisemblablement impossible en une seule étape réactionnelle, une nouvelle voie de valorisation de ces lipases de *C. papaya* a donc été élaborée : l'hydrolyse et l'estérification enzymatiques sélectives d'AGs particuliers.

L'hydrolyse enzymatique sélective (de par la forte *sn*-3 stéréosélectivité des lipases de *C. papaya*) appliquée notamment à l'huile de coprah, devraient permettre un fractionnement de cette huile laurique (contenant la plus part des AGs courts en position *sn*-3) afin de récupérer sélectivement des AGs courts. Ces AGs ainsi récupérés pourront être par la suite

estérifiés par voie enzymatique avec du glycérol afin de synthétiser des TCM. A l'heure actuelle, divers essais d'hydrolyse enzymatique sélective d'huile de coprah par les lipases de *C. papaya* sont en cours de réalisation.

Ces hydrolyses enzymatiques sélectives catalysées par les lipases de *C. papaya* peuvent aussi s'appliquer à d'autres types de substrats lipidiques avec toujours l'objectif de réaliser une sélection discriminative utile d'AGs particuliers. Parmi les autres corps gras potentiellement intéressants, nous pouvons citer les huiles de poisson (source d'EPA et de DHA), l'huile de bourrache ou de pépins de cassis (riche en acide stéaridonique) et des corps gras plus typés comme la matière grasse laitière (source d'AGs courts). Cette sélection discriminative par voie enzymatique d'AGs particuliers pourra aussi se faire avec les préparations de bromélaïne. En effet, les préparations de papaïne et de bromélaïne possèdent toutes les deux de fortes activités de transferts d'acyles en estérification enzymatique. Nous analyserons donc la discrimination de ces préparations enzymatiques (contenant des lipases et des protéases) en fonction des AGs et des alcools utilisés pour l'estérification. Divers alcools primaires et secondaires seront étudiés avec entre autres des AGs de poissons et des AGs courts, afin de synthétiser des composés lipidiques ayant des propriétés physiques et chimiques particulières. Ces biocatalyseurs seront aussi employés pour catalyser des réactions de fixation de divers acides aminés sur des AGs particuliers (synthèse d'amides N-substituées) ou sur des sucres sélectionnés (synthèse d'esters aminés de sucre, type lysinate de fructose,...). Ces composés constituent de nouveaux produits dans l'industrie agro-alimentaire et peuvent être considérés comme des «produits de santé». Nous envisagerons aussi des essais d'extraction et de concentration en bromélaïne dans les divers extraits bruts d'ananas fournis par le CIRAD/Flhor.

CONCLUSION

Cette étude portant sur la caractérisation et la valorisation des activités biocatalytiques de divers latex de *C. papaya* ainsi que de différents extraits d'*A. comosus*, nous a permis de mettre en évidence dans un premier temps les diverses aptitudes de ces extraits bruts végétaux dans le but de catalyser des réactions de protéolyse, de lipolyse, d'acidolyse et de trans- ou interestérification.

Les latex bruts de *C. papaya* provenant des plates-formes du CIRAD/Flhor en Guadeloupe et Madagascar ont été comparés en terme de qualité enzymatique avec les divers lots commerciaux de latex brut de papaye ou de papaine raffinée. Tous les latex bruts possèdent une activité protéasique, lipasique et acyltransférase en transacylation plus ou moins importante, alors que les protéases purifiées du latex ne possèdent aucune activité lipasique (aussi bien en hydrolyse qu'en synthèse). Les variations d'activités des protéases et des lipases ont pu être corrélées avec l'origine géographique des cultures, la variété employée et la fréquence des saignées. Cela a permis de valoriser les premières incisions de latex bruts de papaye originaires de Guadeloupe, pour des réactions de protéolyse et lipolyse enzymatiques ainsi que pour des réactions de biofaçonnement de corps gras. L'activité protéolytique de ces extraits bruts végétaux sont largement supérieures à celles de nombreuses préparations commerciales de papaine (Sigma, Merck, Valley-Research Co.). La fréquence des saignées n'influence guère cette activité protéolytique et la teneur en protéines est quasiment la même dans tous les latex bruts. Les résultats ont aussi permis de constater que les activités des protéases et des lipases du latex diffèrent significativement selon la localisation géographique des cultures, la variété employée et la fréquence des saignées. L'activité protéolytique ne peut être en aucun cas une indication précise de l'aptitude du latex à catalyser des réactions de biofaçonnement des corps gras. Les activités lipasiques des latex bruts fournis par le CIRAD/Flhor restent inférieures à celle du latex brut de papaye provenant d'Afrique et commercialisé par Sigma. La perte d'activité entre deux saignées de papaye réalisées à cinq jours d'intervalle peut atteindre 50 à 60%, que ce soit en lipolyse ou en synthèse enzymatique. De plus, pour une même variété de papaye, ces activités lipasiques évoluent considérablement selon le type de réaction de synthèse mis en œuvre : acidolyse, trans- ou interestérification. Ces activités doivent par conséquent être toujours évaluées indépendamment.

Les extraits bruts d'ananas ont quant à eux de très faibles teneurs en protéines et presque pas d'activité protéasique, en comparaison avec la préparation de bromélaïne commercialisée par Sigma. Cependant, même cette préparation commerciale de bromélaïne exprime de très faibles activités lipasiques avec des TAGs comme substrats (notamment en lipolyse, acidolyse, trans- ou interestérification). L'étude des conditions optimales des réactions d'interestérification biocatalysées par les lipases du latex de *C. papaya* a ensuite été approfondie dans le but de valoriser ces extraits bruts pour des réactions de biofaçonnement des corps gras. Cela correspond au deuxième objectif de ces travaux, à savoir la valorisation

des extraits végétaux de papaye et d'ananas pour des applications au biofaçonnement des produits alimentaires. L'évolution de l'activité du biocatalyseur en fonction de la nature et la longueur de chaîne carbonée des TAGs (notion de sélectivité) a aussi été étudiée en hydrolyse et en interestérification enzymatique. Cela nous a permis de mettre au point des essais d'interestérification sélective d'huile de coprah par les lipases du latex de *C. papaya*, afin de synthétiser des TCM. Les rendements de synthèse n'étaient pas assez significatifs et nous avons donc élaboré une nouvelle voie de valorisation de ces préparations enzymatiques végétales : l'hydrolyse et l'estérification enzymatique sélectives de divers corps gras particuliers. Les réactions d'hydrolyse sélectives catalysées par les préparations de papaïne ou de bromélaïne devraient permettre d'effectuer une sélection discriminative utile d'AGs particuliers. L'estérification sélective de ces AGs particuliers avec un type d'alcool prédéfini devrait aboutir à la synthèse de composés lipidiques avec des propriétés très intéressantes d'un point de vue nutritionnel, cosmétologique ou autres.

Les déterminations d'activité lipasique et de typosélectivité des lipases du latex brut récolté à partir des tiges d'une Euphorbiacée, *Euphorbia characias* (récoltée à Montpellier), ont montré des résultats forts intéressants sur le potentiel de ce latex en tant que biocatalyseur des réactions de biofaçonnement des corps gras. L'activité lipolytique de ce latex est très supérieure à celle du latex brut de *C. papaya*. Compte tenu que les industriels commercialisent à ce jour le plus souvent des préparations de papaïne purifiée (pour les propriétés protéolytiques des protéases solubles en phase aqueuse), cette approche constitue une valorisation non négligeable des autres activités enzymatiques de ces latex végétaux, à savoir l'aptitude à catalyser sélectivement des réactions de lipolyse et de synthèse enzymatique de corps gras. La suite des travaux sera essentiellement axée sur ce biofaçonnement sélectif de corps gras particuliers par les préparations de papaïne et de bromélaïne

REFERENCES

1. Mc Kee, R.A., and H. Smith, Purification of Proteinases from *Carica papaya*, *Phytochemistry* 25: 2283-2287 (1986).
2. Frey-Wyssling, A., Die Stoffausscheidung der Hoheren Pflanzen, Monographien aus dem Gesamtgebiet der Physiologie der Pflanzen und der Tiere, Julius Springer, Berlin, 1935, p. 32.
3. Giordani, R., A. Moulin, and R. Verger, Tributyrorylglycerol Hydrolase Activity in *Carica papaya* and Other Latices, *Phytochemistry* 30: 1069-1072 (1991).

4. Villeneuve, P., M. Pina, D. Montet, and J. Graille, *Carica papaya* Latex Lipase : *sn*-3 Stereoselectivity or Short-chain Selectivity? Model Chiral Triglycerides are Removing the Ambiguity, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72: 753-755 (1995).
5. Villeneuve, P., M. Pina, D. Montet, G. Renard, and J. Graille, Chiral Synthesis of a Triglyceride – Example of 1-Butyroyl 2-Oleyl 3-Palmitoyl *sn* Glycerol, *Chem. Phys. Lipids* 72: 135-141 (1994).
6. Villeneuve, P., M. Pina, D. Montet, C. Ozenne, G. Renard, and J. Graille, Chiral Synthesis of a Given Triglyceride to Characterize Lipase Specificities, *Malaysian Oil Science and Technology* 4: 171-174 (1995).
7. Villeneuve, P., M. Pina, D. Montet, and J. Graille, Determination of Lipase Specificity Through the Use of Chiral Triglycerides and Their Racemics, *Chem. Phys. Lipids* 76: 109-113 (1995).
8. Villeneuve, P., M. Pina, A. Skarbek, J. Graille, and T.A. Foglia, Specificity of *C. papaya* Latex in Lipase-Catalyzed Interesterification Reactions, *Biotech. Tech.* 11: 91-94 (1997).
9. Villeneuve, P., M. Pina, and J. Graille, Mise en Evidence des Selectivités des Lipases en Interesterification à l'aide d'un Triglyceride Chiral Modèle, *Oléagineux Corps Gras Lipides* 3: 459-464 (1996).
10. Graille, J., D. Montet, C. Ozenne, and G. Lamberet, Procédé pour la Transformation des Triglycérides d'une Matière Grasse Laitière, en Particulier la Matière Grasse Laitière, Brevet Européen, n° PCT/FR 94/01192, dépôt 14 octobre 1994, CIRAD-INRA.
11. Mukherjee, K. D., and I. Kiewitt, Specificity of *Carica papaya* Latex as Biocatalyst in the Esterification of Fatty Acids With 1-butanol, *J. Agric. Food Chem.* 44: 1948-1952 (1996).
12. Mukherjee, K. D., and I. Kiewitt, Substrate Specificity of Lipases in Protease Preparations, *J. Agric. Food Chem.* 46: 2427-2432 (1998).
13. Villeneuve, P., A. Skarbek, M. Pina, J. Graille, and T.A. Foglia, Catalytic Behavior of *Carica papaya* Latex in Transesterification Reactions, *Biotech. Techn.* 11: 637-639 (1997).
14. Caro, Y., P. Villeneuve, M. Pina, M. Reynes, and J. Graille, Lipase Activity and Typoselectivities of Plant Extracts in Hydrolysis and Interesterification, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, in press (1999).
15. Graille, J., J.M. Mudherwa, M. Pina, A Method for Determination of Interesterification Activity of Biocatalysts, *Fat. Science Technol.* 89: 224-226 (1987).
16. Mudherwa, J., M. Pina, and J. Graille, Aptitude à la Transesterification de Quelques Lipases Regioselectives 1-3 – I/, *Oleagineux* 43: 385-392 (1988).
17. Green, K.D., and M. Nakajima, Evaluation of Immobilized Modified Lipase : Aqueous Preparation and Reaction Studies in n-Hexane, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 1519-1526 (1998).
18. Madrigal, L. S., A. N. Ortiz, R. D. Cooke, and R. H. Fernandez, The Dependence of Crude Papain Yields on Different Collection ("Tapping") Procedures for Papaya Latex, *J. Sci. Food Agric.* 31: 279-285 (1980).
19. *Recueil de Normes Françaises 1993- Corps Gras, Graines Oléagineuses, Produits Dérivés – 5° Edition*, edited by AFNOR Normes, Paris, 1993, pp. 116-120.
20. Villeneuve, P., and T. A. Foglia, Lipase Specificities : Potential Application in Lipid Bioconversions, *Inform* 8: 640-650 (1997).